

DIE VERTEILUNG EINES
SYSTEMISCH WIRKENDEN AKARIZIDEN THIAZOLINS
ZUR BEHANDLUNG DER VARROATOSE
IM VOLK DER HONIGBIENE
(*APIS MELLIFERA* L.)

Ulrike Eyrich

Aus dem
Tierhygienischen Institut Freiburg
(Leiter: Ltd. Reg.-Vet.-Direktor Dr. H. Bölle)
Arbeit angefertigt unter Leitung von
Dr. W. Ritter

vorgelegt über das
Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. R. Gothe

Die Verteilung eines systemisch wirkenden
akariziden Thiazolins zur Behandlung der Varroatose
im Volk der Honigbiene (*Apis mellifera* L.)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ulrike Eyrich
aus
Landshut

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. H. Zucker
Referent:	Prof. Dr. R. Gothe
Korreferent:	Priv.Doiz. Dr. Dr.habil. H. Gerlach

Tag der Promotion: 25. Juli 1986

Für Heinz



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554624_0071

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Problemstellung	Seite 1
2. Literaturübersicht	3
2.1. Historischer Überblick über die Ausbreitung der Varroatose	3
2.2. Klassifizierung und Beschreibung von Varroa jacobsoni	4
2.3. Wirt-Parasitverhältnis Apis mellifera - Varroa jacobsoni	4
2.4. Pathogenese und Erscheinungsbild der Varroa- tose	6
2.5. Diagnose der Varroatose	8
2.6. Therapiemöglichkeiten der Varroatose	10
3. Eigene Untersuchungen	14
3.1. Material und Methoden	14
3.1.1. Untersuchungen über die Verteilung und Wirkung des Akarizids in Bienen- völkern	14
3.1.2. Untersuchungen über die Verteilung von markiertem Futter in Bienengruppen	26
3.1.3. Untersuchungen über die Verteilung des Akarizids im Bienenkörper. . . .	32
3.2. Ergebnisse	39
3.2.1. Ergebnisse der Untersuchungen über die Verteilung und Wirkung des Akarizids in Bienenvölkern	39
3.2.2. Ergebnisse der Untersuchungen über die Verteilung von markiertem Futter in Bienengruppen	57
3.2.3. Ergebnisse der Untersuchungen über die Verteilung des Akarizids im Bienenkörper	70

4. Diskussion	Seite 83
4.1. Diskussion der Ergebnisse über die Verteilung des Akarizids in Bienenvölkern	83
4.2. Diskussion der Ergebnisse über die Verteilung von Futter in Bienengruppen	88
4.3. Diskussion der Ergebnisse über die Verteilung des Akarizids im Bienenkörper	91
4.4. Gesamtbetrachtung der Ergebnisse	95
5. Zusammenfassung	98
Summary	100
6. Literaturverzeichnis	102

1. Einleitung und Problemstellung

Die Varroatose ist eine durch die Milbe *Varroa jacobsoni* Oudemans, 1904 hervorgerufene Erkrankung der europäischen Honigbiene, *Apis mellifera*. Sie bedroht weltweit die Existenz der Bienenvölker, was nicht nur direkte Auswirkungen für Imker und Honig-Konsumenten hat, sondern in ihren ökologischen Konsequenzen für einen Großteil der Blütenpflanzen auch die Wirtschaftlichkeit von Obst- und Gartenbau betrifft.

Auch für die Tierärzteschaft hat diese Bienenkrankheit eine Bedeutung, da sie nach § 2a der Bienenseuchenverordnung in der Fassung vom 18. 4. 1980 (BGBl. I, S. 441) eine anzeigepflichtige Tierseuche darstellt. Aufgrund der damit verbundenen veterinärpolizeilichen Maßnahmen muß sich zumindest der beamtete Tierarzt mit der Diagnose und Therapie dieser Krankheit befassen.

Nach § 16c der Bienenseuchenverordnung in der Fassung vom Juni 1984 (BGBl. I, S. 1121) ist die Behandlung aller Völker von Bienenständen, auf denen die Varroatose festgestellt wurde, amtlich vorgeschrieben.

Die bisher in der Bundesrepublik Deutschland zugelassenen Präparate gegen die Varroatose beruhen auf einer kontakt-akariziden Wirkung, da sie sich zwischen den Bienen verteilen und die Varroa-Milben von außen erreichen.

Es handelt sich dabei um Brompropylat in Form des Räucherstreifens "Folbex^R-VA-Neu" (CIBA-GEIGY GmbH, Basel) und Ameisensäure in Form der "Illertisser Milbenplatte" (Heinrich Mack Nachf. KG, Illertissen).

Seit Dezember 1985 ist mit "Perizin^R" (Bayer AG, Leverkusen) auch ein systemisch wirkendes Akarizid zur Bekämpfung der Varroatose zugelassen. Systemisch wirkende Akarizide werden von den Bienen mit dem Futter oder nach Aufträufeln auf die Wabengassen oral aufgenommen, gelangen durch den Verdauungskanal in die Hämolymphe der Bienen und werden so

durch den Parasiten aufgenommen (Ruttner et al., 1980).

Durch den sozialen Futteraustausch der Bienen (Nixon und Ribbands, 1952) verteilt sich das Medikament auf alle Mitglieder des Volkes. Dieses Phänomen wurde von Ruttner et al. (1980) anhand der akariziden Wirkung auch bei Bienen, die nur durch Rüsselkontakt mit behandelten Bienen Zugang zu dem Präparat hatten, nachgewiesen.

Auch Shabanov et al. (1984) untersuchten die Verteilung eines varroiziden Wirkstoffes indirekt mittels Isotopenmarkierung. Moritz (1982) verwendete in ähnlichen Untersuchungen neben der Isotopenmarkierung auch einen Farbtracer. Diese Autoren setzten radioaktiv markierte Glucose, Phosphat oder den Farbstoff der Behandlungslösung zu und schlossen von der Verteilung des Tracers auf die des Akarizids.

In der vorliegenden Arbeit soll die Verteilung eines systemisch wirkenden akariziden Thiazolins direkt durch Isotopenmarkierung des Wirkstoffmoleküls untersucht werden. Dabei soll neben dem Nachweis der Verteilung auch eine quantitative Aussage über die Dosis der einzelnen Biene, sowie die Verteilung des Wirkstoffs in ihrem Körper gemacht werden. Zum anderen soll der soziale Futteraustausch unter den Bedingungen der Medikamentenprüfung an Bienengruppen im Labor quantitativ untersucht werden.

2. Literatur-Übersicht

2.1. Historischer Überblick über die Ausbreitung der Varroatose

Von einem harmlosen Parasiten der indischen Honigbiene (*Apis cerana*) hat sich *Varroa jacobsoni* zu einem gefährlichen Schädling der domestizierten europäischen Biene (*Apis mellifera*) entwickelt.

Grobov (1977) gibt einen Überblick über die Entwicklung dieser Parasitose in Asien: *Varroa*-Milben wurden zuerst von Edward Jacobson auf *Apis cerana* in Indonesien entdeckt und 1904 von A.C. Oudemans beschrieben.

Die ersten Zeugnisse des Vorkommens von *Varroa jacobsoni* auf *Apis mellifera* stammen aus der Volksrepublik China und gehen auf das Jahr 1958 zurück. 1964 wurden die ersten Fälle von Varroatose im Osten der UdSSR entdeckt.

Nach Samsinak und Haragasim (1977) wurden 1967 in Bulgarien als erstem europäischen Land *Varroa*-Milben festgestellt und in den Jahren 1976 bis 1980 griff die Varroatose auf alle westlichen Nachbarländer der UdSSR über. In der Bundesrepublik Deutschland wurde 1977 ein Infektionsherd im Taunus um das Institut für Bienenkunde der Universität Frankfurt entdeckt (Ruttner und Ritter, 1980), von wo sich die Parasitose bis 1984 auf die ganze Bundesrepublik ausbreitete (Rojahn, 1984).

Weltweit waren bis 1983 der ganze eurasische Kontinent, sowie Südamerika und Nordafrika von der Krankheit erfaßt (Nixon, 1983). Derzeit gilt nur noch Australien als sicher varroatosefrei (Ritter, 1986 b).

2.2. Klassifizierung und Beschreibung von *Varroa jacobsoni*

Als Milbe gehört *Varroa jacobsoni* Oudemans, 1904 in der zoologischen Systematik zum Stamm der Arthropoden, der Klasse Arachnida und der Ordnung Parasitiformes. In der Unterordnung Gamasoidae wird sie der Familie Dermanyssidae, Unterfamilie Varroinae zugerechnet (Grobov, 1977; Langhe und Natzkii, 1977).

Varroamilben sind als querovale braune Schildchen zu erkennen. Nach Grobov (1977) ist ein erwachsenes Weibchen 1.0 bis 1.7 mm lang und 1.5 bis 1.9 mm breit. Der dorsoventral abgeplattete Körper wird nahezu vollständig durch einen braunen Rückenschild bedeckt, der mit borstigen Haaren besetzt ist (Liu, 1982). Das Gnathosoma ist mit seinen rinnenförmigen Chelizeren an eine stechend-saugende Nahrungsaufnahme angepaßt (Cromroy und Kloft, 1978).

Das Männchen ist gelblich gefärbt, fast rund und kleiner als das Weibchen (0.85 x 0.8 mm). Seine Mundwerkzeuge sind zur Übertragung von Spermien löffelförmig umgebildet (Langhe und Natzkii, 1977).

2.3. Wirt-Parasitverhältnis *Apis mellifera* - *Varroa jacobsoni*

Auf adulten Bienen sind nur begattete *Varroa*-Weibchen zu finden. Diese sitzen bevorzugt zwischen den vorderen Abdominal-Skleriten, aber auch zwischen Kopf und Thorax oder Thorax und Abdomen. Wie Sadov (1976) mit Strontium 90 als Tracer nachwies, ernähren sich die Milben hauptsächlich von der Hämolymphe der Bienen.

Zur Fortpflanzung suchen *Varroa*-Weibchen Brutzellen der Bienen kurz vor der Verdeckelung auf. Drohenbrut, in der

beim ursprünglichen Wirt, *Apis cerana*, die Fortpflanzung ausschließlich stattfindet (Ritter et al., 1980; Koeniger et al., 1981), wird dabei bevorzugt befallen.

Wie Hänel (1983) herausfand, spielt der Juvenilhormon-Titer eine entscheidende Rolle für die Auslösung der Eiablage bei Varroa-Milben.

Die Entwicklung der Varroa-Nachkommenschaft wurde von Ifantidis (1983) untersucht. Nach seinen Angaben wird das erste Ei ca. 60 Stunden nach der Verdeckelung abgelegt, zu dem Zeitpunkt, zu dem die Bienenlarve ihren Coccon fertig gesponnen hat. Aus diesem Ei geht ein Weibchen hervor, während sich das als zweites abgelegte Ei zu einem Männchen entwickelt. Aus allen übrigen Eiern entstehen in der Regel wiederum Weibchen.

Für die Entwicklung der Milbeneier über ein Larvenstadium, Protonymphen und Deutonymphen, bei der sich Phasen aktiver Nahrungsaufnahme mit Ruhephasen abwechseln, werden unterschiedliche Zeiträume angegeben: Während Jan-Tin-He (1965) einen Entwicklungszyklus von 7 Tagen feststellte, gibt Salchenko (1966; 1972) einen Zeitraum von 8-9 Tagen für das Weibchen und 6-7 Tage für das Männchen an. Ifantidis (1983) fand bei Weibchen eine Entwicklungsdauer von 7.1 bis 8.3 und bei Männchen von 4.9 bis 6.0 Tagen.

Das Geschlecht der Varroa-Milben wird nach de Ruijter und Pappas (1983) durch Haplo-Diploidie festgelegt. Das Männchen mit dem haploiden Chromosomensatz ($n = 7$) geht aus einem unbefruchteten Ei hervor; Weibchen entstehen aus befruchteten Eiern und weisen die doppelte Chromosomenzahl ($2n = 14$) auf.

Auf Grund seiner kürzeren Entwicklungszeit wird das Männchen als erstes adult. Nach Langhe et al. (1976) sind seine Mundwerkzeuge nicht zur Nahrungsaufnahme geeignet. Die Paarung mit den weiblichen Jungmilben erfolgt noch in der verdeckelten Brutzelle (Grobov, 1977). Beim Schlüpfen der Biene werden die begatteten Weibchen (Mutter und Töchter) frei und können neue Brutzellen befallen, das Männchen sowie

Nymphen, Larven und Eier gehen zugrunde (Grobov, 1977). Die Lebensdauer weiblicher Varroa-Milben wird von Langhe und Natzkii (1977) im Sommer mit 2 Monaten, im Winter mit mindestens 5 Monaten angegeben.

Nach Grobov (1977) suchen 78% der Milbenweibchen einmal, 18% zweimal und 4% dreimal und öfter eine Brutzelle zur Fortpflanzung auf. In einer Arbeiterinnenzelle, die 12 Tage lang verdeckelt bleibt, kann ein Varroa-Weibchen 1.33 voll entwickelte Töchter hervorbringen. Aus Drohnenzellen gehen in 15 Tagen Verdeckelungszeit 2.77 adulte weibliche Nachkommen hervor (Ifantidis, 1984).

2.4. Pathogenese und Erscheinungsbild der Varroatose

Varroa-Milben saugen Hämolymphe sowohl bei Bienenlarven und -puppen, als auch bei Imagines. An erwachsenen Bienen ist dadurch eine erhebliche Beunruhigung festzustellen (Grobov, 1977). Weitaus bedeutender ist jedoch die Schädigung durch die Vermehrung in der Brutzelle. De Jong et al. (1982) stellte einen Gewichtsverlust bei schlüpfenden Arbeiterinnen fest, der in Abhängigkeit von der Zahl der Milben 6.3 bis 25.3% betrug. Sadov (1976) fand neben einem geringeren Gewicht bei befallenen Puppen auch einen 15-20% niedrigeren Gehalt an Gesamtproteinen als bei Varroa-freien. Insbesondere, wenn mehrere Varroa-Weibchen in die gleiche Zelle eindringen, kommt es zu sichtbaren Entwicklungsstörungen der Puppe. Man kann dann Deformationen der Flügel und Beine bis zu kleinen Stummeln, sowie eine deutliche Verkürzung des Abdomens beobachten. Solche Bienen sind nur begrenzt lebens- und arbeitsfähig. Oft sterben die Puppen schon in der Zelle ab.

Die bevorzugt befallene Drohnenbrut ist besonders stark betroffen. Drohnen, die einen starken Befall überleben, sollen sexuell impotent sein (Smirnov, 1979).

Natzkii teilt nach Grobov (1977) den Verlauf der Varroatose in *Apis mellifera*-Völkern in drei Stadien ein:

Im ersten, latenten Stadium, wenn der Infestationsgrad unter 0.5% der Bienenpopulation liegt, ist die Erkrankung sehr schwer diagnostizierbar. Im zweiten Stadium, bei einem Infestationsgrad von 0.5-30% ist die Feststellung mit speziellen Diagnoseverfahren möglich. Erst im dritten Stadium, wenn mehr als 30% der Bienen parasitiert werden, treten klinische Erscheinungen auf.

Dieser Zustand tritt vorzugsweise im Spätsommer auf, wenn die Bienenpopulation - nach einer starken Milbenvermehrung während des Sommers - abnimmt.

Es können dann gehäuft verkrüppelte und tote Bienen vor den Fluglöchern gefunden werden. Die Völker werden zusehends schwächer, bis nur noch die Königin mit wenigen Bienen im Stock bleibt (Deger, 1983). Im Brutnest entstehen Lücken und es finden sich abgestorbene Rundmaden, sowie tote Puppen unter eingefallenen Zelldeckeln. Grobov (1977) beschreibt, daß überwinternde Völker keine Wintertraube bilden, sondern die Bruttätigkeit fortsetzen. Er beobachtete die meisten Völkerzusammenbrüche im Winter.

Abgesehen von der direkten Schädigung durch die Milbenvermehrung schädigt *Varroa* ihren Wirt noch durch die Übertragung anderer Krankheiten. Smirnov (1979) berichtet über gehäuftes Auftreten von Septikämie, Haffnyose (Paratyphus durch *Enterobacter haffnia*) und Nosematose in *Varroa*-befallenen Völkern. Im Experiment konnten Smirnov und Kudrjawzew (1977) *Bacillus larvae* (den Erreger der Amerikanischen Faulbrut) durch *Varroa*-Milben von kranken auf gesunde Bienenvölker übertragen.

Im Endstadium der Varroatose tritt häufig das klinische Bild der Europäischen Faulbrut auf, so daß auch *Melissococcus pluton* als Sekundärerreger diskutiert wird (Ritter und Koch, 1986). Ball (1983) wies das Virus der Akuten Paralyse (APV) in großen Mengen in Bienen mit Varroatose nach. Sie vermutet,

daß dieses häufig auf Bienen vorkommende, normalerweise apathogene Virus beim Saugakt von Varroa-Milben in die Hämolymphe eindringen, sich stark vermehren und damit pathogen werden kann.

2.5. Diagnose der Varroatose

Eine klinische Diagnose der Varroatose ist erst möglich, wenn der Befallsgrad die Schadschwelle von 30% (Grobov, 1977) überschreitet. Um die Wirtschaftlichkeit der Bienenvölker zu gewährleisten, sollte die Behandlung möglichst schon vor diesem Stadium einsetzen, was gezielte Verfahren zur Frühdiagnose erfordert. Dazu eignet sich die Untersuchung von Brutproben, erwachsener Bienen und das Einsammeln toter Milben mit Bodeneinlagen.

Bei der Untersuchung einer Brutprobe sollte der Drohenbrut aufgrund ihres stärkeren Befalls mit Varroa-Milben der Vorzug gegeben werden. Um einen Befallsgrad von 1% noch feststellen zu können, müssen mindestens 457 gedeckelte Brutzellen untersucht werden (Ritter und Ruttner, 1980). Diese Brutproben können nach einem vereinfachten Verfahren (Ritter et al., 1983) routinemäßig untersucht werden.

Wird eine Probe adulter Bienen untersucht, so sind zur Feststellung eines Befallsgrades von 1% 300 bis 500 Bienen nötig (Ritter und Ruttner, 1980). Diese werden in einem geschlossenen Behältnis getötet. In den Untersuchungsstellen werden diese Proben in Waschbenzin geschüttelt, so daß die Milben nach dem von den genannten Autoren beschriebenen Verfahren abgesiebt werden können.

Natürlicherweise abgefallene Milben können über einen längeren Zeitraum auf mit einem Gitter bespannten Bodeneinlagen gesammelt werden (Ritter und Ruttner, 1980). Das Wintergemüll wird von Oktober bis Mitte März, das Sommer-

gemüll von August bis September gesammelt (Ritter, 1984).

In Untersuchungsstellen werden die getrockneten Gemülle im Flotationsverfahren nach Brem (1980) mit Alkohol bearbeitet. So können auch Sammelproben aller Gemülle eines Bienenstandes untersucht werden.

Die Sicherheit der Diagnose mit Bodeneinlagen läßt sich durch eine diagnostische Therapie noch steigern. Ihre Aussagekraft ist allerdings abhängig von der Wirksamkeit des angewendeten Akarizids (Ritter und Ruttner, 1980). Die vor der Behandlung eingeschobene Bodeneinlage wird danach auf abgefallene Milben kontrolliert. Da sich Milben in gedekkelten Brutzellen der Diagnose entziehen, sollte die Behandlung in brutfreien Völkern erfolgen, also im Herbst oder zeitigen Frühjahr, wenn auch die Gefahr der Rückstandsbildung gering ist.

Varroa-Weibchen werden oft mit der ebenfalls auf Bienen lebenden Bienenlaus *Braula coeca* verwechselt. Aufgrund ihrer Größe und Farbe sehen sich Varroa und die Bienenlaus beim ersten Hinsehen sehr ähnlich. Als Insekt ist *Braula* jedoch deutlich in Kopf, Brust und Hinterleib gegliedert und hat drei Beinpaare. Sie unterscheidet sich auch durch ihre längliche Körperform von der querovalen Varroa-Milbe (Örösi-Pal, 1977).

Im fortgeschrittenen Stadium der Varroatose wird das Brutnest der Bienenvölker lückenhaft und es fallen eingefallene Zelldeckel auf (Deger, 1983). Diese Erscheinungen treten auch bei der Europäischen Faulbrut auf. Die Diagnose der Varroatose ist dann durch den Milbennachweis zu stellen, der im klinisch manifesten Stadium mit allen Diagnose-Methoden leicht zu erbringen ist.

2.6. Therapiemöglichkeiten der Varroatose

Kontakt-Akarizide

Aus der breiten Palette der in der Welt angewendeten Akarizide sind in der Bundesrepublik Deutschland 3 zugelassene Präparate im Handel: Der Räucherstreifen "Folbex^R-VA-Neu", die "Illertisser Milbenplatte", sowie das systemische Präparat "Perizin^R".

Ein Streifen Folbex^R-VA-Neu (CIBA-GEIGY AG, Basel) enthält 411 mg Isopropyl-4',4'-dibrombenzilat, das sich mit dem Rauch im Bienenstock verteilt und die Milben beim direkten Kontakt abtötet. Um Rückstände im Honig zu vermeiden, darf das Medikament nur außerhalb der Trachtzeit angewendet werden (Ritter und Perschil, 1982). Dann wird viermal im Abstand von 4 Tagen abends ein Räucherstreifen im Bienenstock abgeglimmt. Der größte Behandlungserfolg liegt mit 97% abgefallener Milben bei der Herbstbehandlung von brutfreien Völkern. Es ist aber auch die Behandlung im zeitigen Frühjahr oder bei der Bildung von Kunstschwärmen im Sommer möglich.

Die Illertisser Milbenplatte (Heinrich Mack Nachf. KG, Illertissen) enthält 14.2 g wasserfreie Ameisensäure, die nach dem Verdunsten im Bienenstock ebenfalls eine kontakt-akarizide Wirkung auf Varroa-Milben hat. Diese Platte soll nach Wachendörfer et al. (1985) so über den Bienensitz gelegt werden, daß Ameisensäure nach allen Seiten abdampfen kann. Ihre Wirkung ist temperaturabhängig und liegt im Anwendungsbereich von 12 bis 25°C zwischen 78 und 91%. Aufgrund der Rückstandssituation empfehlen die Autoren die Behandlung nur im Spätsommer und Herbst nach der Honigernte.

Systemische Akarizide

Das systemische Medikament Perizin^R (Bayer AG, Leverkusen) enthält in 1 ml 32 mg Dichlophos. Zur Behandlung soll zweimal im Abstand von 7 Tagen pro Volk 1 ml Perizin^R, in 49 ml Wasser emulgiert, angewendet werden (Ritter, 1986 a). Damit die Emulsion von den Bienen oral aufgenommen werden kann, wird sie auf die Bienen in den Wabengassen aufgeträufelt. Nach Ritter (1986) wird durch die zweimalige Behandlung ein Behandlungserfolg von 91 bis 97% abgetöteter Milben erreicht.

Biotechnische Maßnahmen

Die Anwendung rein biotechnischer Maßnahmen gegen die Varroatose bietet den Vorteil von rückstandsfreien Bienenprodukten, ist aber mit höherem Arbeitsaufwand bei geringerer Wirksamkeit verbunden.

Die Vernichtung von gedeckelter Drohnenbrut bietet eine Möglichkeit, die Milbenpopulation zu reduzieren, da Varroa-Weibchen bevorzugt Drohnenbrut zur Fortpflanzung aufsuchen. In einem Baurahmen (leeres Holzrähmchen für freien Wabenbau) legen Bienenvölker Drohnenbrut an. Wenn das übrige Brutnest von Drohnenzellen freigehalten wird, konzentriert sich alle Drohnenbrut auf diesen Baurahmen. Er wird in regelmäßigen Abständen - sobald die Zellen verdeckelt sind - aus dem Volk entfernt. Diese Maßnahme sollte, am besten mit zwei Baurahmen im Wechsel, während der ganzen Drohnen-Saison durchgeführt werden (Ruttner und Koeniger, 1980).

Nach Rosenkranz und Engels (1985) ist es möglich, durch Drohnenbrut-Entnahme das Erreichen der Schadschwelle 1 bis 2 Jahre hinauszuzögern. Bei anderen Untersuchungen konnten jedoch mit der Drohnenbrut, sowohl in stark als auch schwach befallenen Völkern, nur weniger als 10% der Milben eliminiert werden (Ritter, 1984).

Auch durch Beschränkung und Entnahme von Arbeiterinnenbrut lassen sich Milben aus dem Volk entfernen. Wie Maul (1983) empfiehlt, soll die Königin mittels Wabentaschen (Taschen aus Absperrgittern) zur Eiablage auf einer einzigen Wabe gezwungen werden. Nacheinander werden so die für *Varroa* empfänglichen Brutstadien jeweils auf einer Wabe konzentriert und nach der Verdeckelung aus dem Volk entfernt und vernichtet. Nach Ruttner und Koeniger (1980) eliminiert dieses Verfahren durchschnittlich 76.7% der Milben aus dem Volk, ist jedoch sehr arbeitsaufwendig und bedeutet unter Umständen eine Schwächung der Völker durch die Unterbrechung der Brutaufzucht (Ritter, 1984).

Da *Varroa*-Milben hitzeempfindlicher sind als Bienen, bietet sich eine Thermobehandlung der befallenen Völker an (Schley und Heinz, 1985). Nach russischem Beispiel werden Bienen ohne Waben in einer Wärmekammer 12 Minuten lang einer Temperatur von 47°C bei niedriger Luftfeuchtigkeit ausgesetzt. Die technischen Einzelheiten für dieses Behandlungsverfahren werden derzeit noch erarbeitet. Angaben aus der russischen Literatur zufolge sollen 95% der Milben abgetötet werden (Wahl, 1978).

Biologische Kontrolle

Es zeigen sich auch erste Hinweise auf die Möglichkeit einer biologischen Bekämpfung der Varroatose bei der europäischen Honigbiene, *Apis mellifera*.

Aus Brasilien (de Jong et al., 1984) und Uruguay (Ruttner et al., 1984) wird von befallenen Bienenvölkern berichtet, in denen auch ohne Behandlung keine Schadwirkung durch Varroatose auftritt.

Ritter und de Jong (1984) konnten zeigen, daß im tropischen Südamerika 57% der in Arbeiterzellen eingedrungenen Milben ohne Nachkommen blieben, während in Europa und dem mittleren Osten nur 24 bzw. 22% der *Varroa*-Weibchen auf Arbeiterpuppen unfruchtbar waren. Damit liegen ähnliche Verhältnisse vor wie bei *Apis cerana* (Ritter et al., 1980; Koeniger et al., 1981).

Da dieses Phänomen auch bei Europäischen Bienenrassen in Brasilien auftritt, vermuten die Autoren hauptsächlich klimatische Gründe für die geringere Fortpflanzungsrate in Südamerika.

Ruttner et al. (1984), die in Uruguay ebenfalls 60-90% unfruchtbare Milbenweibchen in Arbeiterzellen fanden, diskutieren dafür genetische Dispositionen der Biene oder der Milbe, sowie klimatische Faktoren. Da nach Hänel (1983) der Juvenilhormon-Titer der Bienenlarve bei Varroa-Milben die Eiablage auszulösen vermag, ziehen sie auch hormonelle Mechanismen für diese Reproduktionshemmung in Betracht.

Auf einem anderen Mechanismus beruht die von Moritz und Hänel (1984) festgestellte beschränkte Vermehrungsrate von *Varroa jacobsoni* in Völkern der afrikanischen Kapbiene (*Apis mellifera capensis*). Bei dieser Biene beträgt die Verdeckelungszeit von Arbeiterinnenbrut nur 9.6 Tage, so daß nur 21% der Varroa-Töchter adult werden können, bevor die Biene schlüpft.

Diese Beispiele zeigen, daß auch *Apis mellifera* über Mechanismen verfügt, einen Befall mit Varroa-Milben tolerieren zu können. Es zeichnen sich damit eventuell erste Schritte zu einer Anpassung des Wirt-Parasit-Verhältnisses ab. Jedoch sind noch weitere Erkenntnisse nötig, bevor solche Mechanismen gegen die Varroatose eingesetzt werden können.

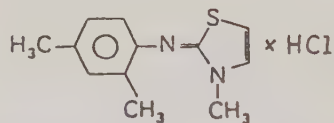
3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Untersuchungen über die Verteilung des Akarizids in Bienenvölkern

Die Verteilung des akariziden Wirkstoffs im Bienenvolk wurde mittels einer Isotopen-Tracer-Methode verfolgt.

Bei dem untersuchten Akarizid handelt es sich um das 2-(2',4'-dimethyl-phenylamino)-3-methyl-4-thiazolinhydrochlorid mit der Bezeichnung CGA-50439 x HCl oder CGA-192397 und folgender Strukturformel:



Der Wirkstoff soll von der Firma CIBA-GEIGY AG unter dem Handelsnamen "Apitol^R" auf den Markt gebracht werden. Im folgenden wird er jeweils mit der Code-Nr. CGA-50439 bezeichnet.

Die Substanz zeigt nur im sauren Bereich eine nennenswerte Wasserlöslichkeit (pH 3: 20%), löst sich aber gut in organischen Lösungsmitteln (z.B. Methanol, Benzol: 80%). Der Stoff hat einen Schmelzpunkt von 44°C und ist nicht flüchtig (Produkt-Information der Fa. CIBA-GEIGY).

In der radioaktiv markierten Form enthält eine Methylgruppe am Benzolring das Isotop Kohlenstoff-14. Für die Versuche standen 3.0 mg kristalliner Reinsubstanz mit einer Aktivität von 100 µCi (3.7 MBq) zur Verfügung. Diese wurden in 1.0 ml 0.5-molarer Salzsäure gelöst, so daß 1 µl einer Aktivität von 0.1 µCi (3.7 kBq) entsprach.

Diese radioaktive Stammlösung wurde für die Versuche mit

einem nicht-radioaktiven Anteil, dem "Apitol^R-G15", auf die benötigte Wirkstoffkonzentration eingestellt. "Apitol^R-G15" ist eine granuliert Formulierug des Wirkstoffs mit 15% Reinsubstanzgehalt.

Die Lösung zur Behandlung der Völker setzte sich aus 360 µl radioaktiver Stammlösung und einem nicht radioaktiven Anteil von 3.0 g "Apitol^R-G15"-Granulat in 150 ml Leitungswasser zusammen.

Für jede von Bienen besetzte Wabengasse wurde eine Menge von 5 ml dieser Lösung aufgewendet. Das bedeutet 15.0 mg Wirkstoff und 1.2 µCi (4.44 kBq) pro Wabengasse. Unter der Annahme, daß sich 1500 Bienen in einer besetzten Wabengasse aufhalten, führt die Aufwandsmenge von 5 ml Behandlungslösung zu einer durchschnittlichen Dosis von 10 µg Wirkstoff pro Biene.

Für die Untersuchung der Verteilung des radioaktiv markierten Akarizids standen im Winter 4, im Sommer 2 Völker von *Apis mellifera carnica* zur Verfügung, die jeweils 5 Zanderwaben besetzten.

Die Versuche für die Winterperiode wurden vom 9. bis 13. Februar 1985 durchgeführt.

Da die Bienen zu dieser Zeit eine Wintertraube bildeten und nicht ausflogen, konnte über und unter den Waben jeweils Gaze (3 mm Maschenweite) gespannt werden, die verhindern sollte, daß bei Störungen radioaktiv kontaminierte Bienen aufflogen. Der Beutenboden unter der Gaze war mit einer Papiereinlage abgedeckt, die bei jeder Probenahme gewechselt wurde, um die abgefallenen Milben einzusammeln.

Zwei Völker (A und B) wurden in einem Kühlraum bei konstanter Temperatur von 2.5°C (Schwankungen von 0.5°C) und 75-80% relativer Luftfeuchtigkeit aufgestellt.

Die beiden übrigen Völker (C und D) blieben im Freiland stehen und waren Temperaturschwankungen zwischen -15°C und +9°C ausgesetzt. Die Luftfeuchte bewegte sich im Versuchszeitraum zwischen 28 und 85%. Diese Klimawerte wurden mit

einem Thermohygrographen (Typ 252 Ua, Wilhelm Lambrecht GmbH, Göttingen) aufgezeichnet.

Im Sommer erstreckte sich der Versuchszeitraum vom 10. bis zum 17. Juli 1985.

Um den Bienen die Möglichkeit zum Ausfliegen zu belassen und trotzdem das Abfliegen von kontaminierten Bienen zu vermeiden, standen die Sommervölker (E und F) in bienendichten Flugzelten. Zweimal täglich wurde ihnen in diesen Zelten Zuckerlösung (30%ig) in einer Kunststoffschale zu Eintragen angeboten.

Während der Versuchszeit herrschten Temperaturen von +14°C bis +29°C und die relative Luftfeuchtigkeit schwankte von 30 bis 80% (Auskunft des Deutschen Wetterdienstes Freiburg).

Die Behandlung mit dem Akarizid erfolgte bei allen 6 Völkern auf die gleiche Weise: Die Behandlungslösung wurde mit einer 5 ml-Einmalspritze und Kanüle durch die Gazeabspannung auf die Bienen aufgeträufelt.

Die anhand der besetzten Wabengassen geschätzte Volkstärke wurde nach Versuchsende durch Wiegen der abgetöteten Bienen überprüft, wobei ein Gewicht von 0.1 g pro Biene zugrundegelegt wurde. Etwa 600 Bienen wurden durch die Probenahme entfernt und mußten zur Bienenzahl bei Versuchsende addiert werden, damit sich die Anzahl zu Beginn ergab.

Die Probenahmen erfolgten in Abständen von 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 und 96 Stunden nach Applikation des Medikaments. Bienen wurden an mehreren Stellen durch einen Schlitz in der Gazeabspannung aus dem Stock gesaugt. Dabei kam ein Exhauster zum Einsammeln von Insekten in Verbindung mit einem Staubsauger (AEG Lilliput, 180 Watt) zur Anwendung. Ein lockerer Wattebausch am hinteren Ende der Sammeleinrichtung sollte verhindern, daß Tröpfchen den Staubsauger radioaktiv kontaminierten. Sobald genügend Bienen eingesammelt waren, wurden sie durch Wenden des Staubsaugers in einen Käfig aus Draht-

geflecht geblasen. Dabei wirkte der Wattebausch als Verschluss für den Käfig.

Da Bienen bei starker Erregung den Inhalt ihrer Honigblase, des Kropfes, erbrechen, mußten sie möglichst ohne Agonie getötet werden. Der Drahtkäfig wurde daher für Teile einer Sekunde in flüssigen Stickstoff (-196°C) eingetaucht, so daß die Bienen schockgefroren wurden. Gleich anschließend wurden sie in Gefrierbeutel verpackt und bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert. Der Stichprobenumfang betrug im Winter ca. 30, im Sommer etwa 50 Bienen bei jeder Entnahme.

Im Sommer wurden zusätzlich bei jeder Probenahme die toten Bienen vor dem Flugloch eingesammelt. Es gelangten jedoch nur die äußerlich unversehrt erscheinenden Bienen zur Untersuchung auf Radioaktivität.

Gleichzeitig mit jeder Entnahme von Bienenproben wurden auch die abgefallenen Milben auf der Bodeneinlage eingesammelt, gezählt und tiefgefroren. Für die Untersuchung auf Radioaktivität wurden sie zu Sammelproben zusammengefaßt.

Nach dem Abtöten der Völker zu Versuchsende wurden auch die auf den Bienen verbliebenen Milben abgesammelt, gezählt und ebenfalls zu Sammelproben vereinigt.

Bienenbrut wurde beim Abtöten der Völker nach Versuchsende entnommen. Die Brutflächen auf den Waben wurden ausgeschnitten und bis zur Untersuchung tiefgefroren.

In den Wintervölkern konnten die Königinnen kontinuierlich Eier ablegen, so daß Brut in allen Stadien vorhanden war. Die Brutflächen von ca. 200 bis 250 cm^2 pro Volk wurden 4 Tage nach der Behandlung mit dem Akarizid entnommen.

Nach Weiss (1980) läßt sich aus der Entwicklungsdauer der Bienenbrut ableiten, in welchem Stadium sich die entnommene Brut zur Zeit der Akarizid-Anwendung befunden haben muß (Abb. 1). Streckmaden befanden sich 4 Tage vorher im 3. Larvenstadium, der Periode der stärksten Nahrungsaufnahme. Rundmaden des 5. Larvenstadiums wurden im 1. und 2. Larven-

stadium behandelt, während die als Larve 3 und Larve 4 entnommenen Maden erst nach der Medikamentenapplikation aus dem Ei geschlüpft waren.

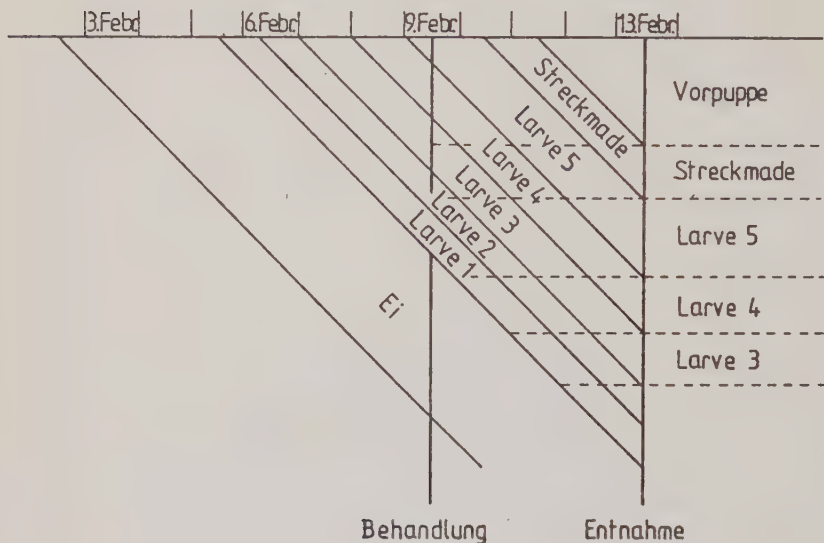


Abb. 1: Altersbestimmung und Entwicklung der Brut in Wintervölkern

Im Sommer wurden die Völker vor Versuchsbeginn brutfrei gemacht. Dazu wurden die Königinnen drei Wochen lang in Käfigen gesperrt. Um Larven während der stärksten Futteraufnahme untersuchen zu können, wurde den Völkern Brut im 2. und 3. Larvenstadium zugehängt und 12 Stunden später die Behandlung durchgeführt. Am Entnahmetag hatten sich die Larven bis zu 12 Tage alten Puppen entwickelt (vgl. Abb. 2).

Die Königinnen konnten ab 12 Stunden vor der Behandlung wieder Eier legen. Diese nahmen vom 3. Versuchstag an als Larven ebenfalls Nahrung auf. Sie hatten am Entnahmetag maximal das 5. Larvenstadium erreicht.

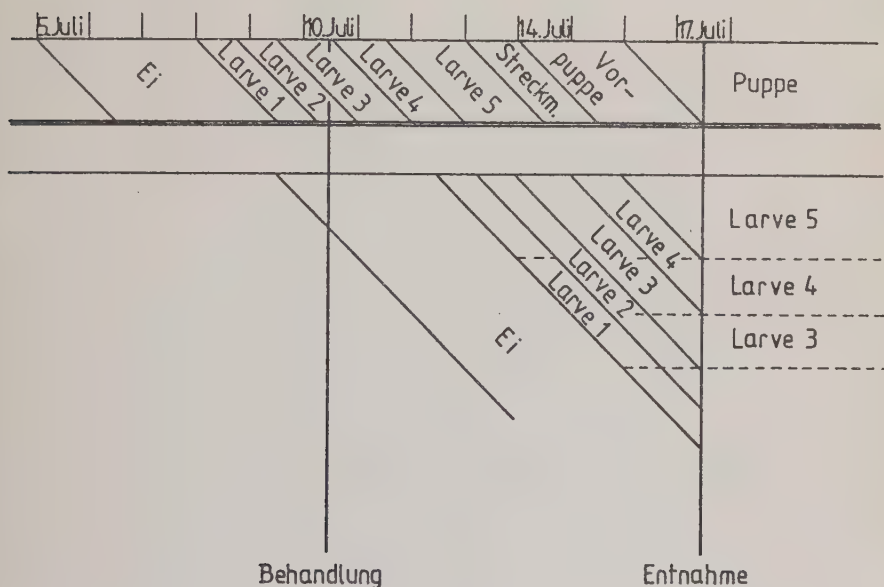


Abb. 2: Altersbestimmung und Entwicklung der Brut in Sommervölkern

Für die Untersuchung wurden Brutproben mit annähernd gleichem Gewicht zusammengestellt. Puppen, Streckmaden und Maden im 5. Larvenstadium bildeten daher als Einzelindividuen eine Probe. Im 4. Larvenstadium wurden 5 Maden zu einer Probe zusammengefaßt und Larven vor der 3. Häutung ergaben Sammelproben von je 10 Einzeltieren.

Die Radioaktivität in den Organ- und Bienenproben wurde nach dem folgendem Prinzip bestimmt.

Kohlenstoff-14 ist ein β -Strahler mit einer Halbwertszeit von 5760 Jahren, der beim Zerfall zu Stickstoff Elektronen aussendet. Diese β -Teilchen regen in Abhängigkeit von ihrer Ausgangsenergie unterschiedlich viele Lösungsmittelmoleküle bei Zusammenstößen an. Die Lösungsmittelmoleküle geben ihre Anregungsenergie als kurzwelliges Licht wieder ab, das in einem "Szintillations-Cocktail" von fluoreszierenden Stoffen, sogenannten Szintillatoren, in längerwelliges Licht umgewandelt wird und außerhalb der Probe mit Photoverstärker-Röhren als elektrischer Impuls gemessen werden kann. Dabei ist die Energie des Impulses der Ausgangsenergie des Elektrons proportional.

Durch aufarbeitungsbedingte Eigenschaften der Probe, insbesondere Farbstoffe und UV-adsorbierende Moleküle, kann jedoch ein Teil der Lichtenergie adsorbiert und ausgelöscht werden. Diese als "Quench-Phänomen" bezeichnete Auslöschung vermindert sowohl die Energie als auch die Anzahl der gemessenen Impulse, so daß die Ausbeute der Szintillationszählung herabgesetzt wird. Aus diesem Grund wird eine Korrektur der Meßwerte anhand einer für die jeweiligen Meßbedingungen aufgestellten Quench-Korrektur-Kurve nötig (Cooper, 1980).

Die Szintillations-Cocktails wurden in einem quantitativ arbeitenden Verbrennungsautomaten hergestellt (TRI-CARB^R-Sample-Oxidizer, Modell 306 der Firma Packard Instruments GmbH, Frankfurt).

Für dieses Gerät mußten die Bienen-, sowie Milben- und Brutproben in fingerhutgroßen Probengefäßen aus aschefreiem Papier (Combusto-Cône, Bestellnr. 5065913 der Fa. Packard Instrument GmbH) vorbereitet werden.

Im Verbrennungsautomaten wird der organische Kohlenstoff, also auch C-14, durch Oxidation in CO₂ überführt und in gebundener Form ins Probenfläschchen gespült. Dazu wird in

einer Verbrennungskammer mit Sauerstoff-Überdruck die Probe einschließlich des Probengefäßes (Combusto-Cone) durch eine elektrisch beheizte Platin-Spirale entzündet und vollständig oxidiert. Der Sauerstoffstrom transportiert die Verbrennungsgase durch eine Säule, die mit CO_2 -adsorbierender Lösung gefüllt ist. Nach Beendigung des Verbrennungsvorgangs wird diese C-14-haltige Lösung in ein Probenfläschchen zur Szintillationszählung (Zinsser Polyvials 714, Bestellnr. 3071401 der Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt) entleert und die Säule mit Szintillationsflüssigkeit gespült, die in dasselbe Gefäß entleert wird.

Zur Adsorption von Kohlendioxyd wurden 7 ml Carbosorb^R (Best.-Nr. 6013709, Fa. Packard) verwendet und als Szintillationslösung 10 ml Permaflour^{RV} (Best.-Nr. 6013129, Fa. Packard). Die Verbrennungszeit wurde auf 22 Sekunden festgelegt.

Um die Oxidationsausbeute zu überprüfen, wurde vor und nach jeder Probenserie ein Test durchgeführt. Definierte Mengen einer radioaktiven Lösung wurden auf aschefreie Papierkissen (Combusto-Pads, Bestellnr. 5067034, Fa. Packard) pipettiert und durch Oxidation im Gerät in den Cocktail überführt. Zum Vergleich wurden die gleichen Mengen derselben Lösung direkt zum Cocktail pipettiert und ebenfalls gemessen.

Die Oxidationsausbeute wurde dann aus den Zerfällen pro Minute (DPM) in den Testproben nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Oxidationsausbeute} = \frac{1/2(\text{DPM}_{A1} + \text{DPM}_{A2}) + 1/2(\text{DPM}_{E1} + \text{DPM}_{E2})}{\text{DPM}_{Z1} + \text{DPM}_{Z2}}$$

A1, A2 = Test-Verbrennungen am Anfang der Serie

E1, E2 = Test-Verbrennungen am Ende der Serie

Z1, Z2 = Zupipettierungen

Falls die Oxidationsausbeute unter 0.95 lag, wurden alle Meßwerte der Probenserie mit einem Korrekturfaktor (Kehrwert der Ausbeute) multipliziert.

Als Meßgerät wurde ein Flüssigkeits-Szintillationszähler (Modell 1215 Rackbeta II der Firma LKB-Instrument GmbH) verwendet, der nicht über ein Programm zur automatischen Quench-Korrektur verfügt.

Die Diskriminatoren des Geräts können ein Energiespektrum von 1 bis 2800 keV abdecken, das in 256 "Energie-Niveau-Zahlen" unterteilt ist. Das Fenster des Meßkanals zur Bestimmung der Impulsrate (CPM) wurde zwischen den Energieniveaus 8 und 170 festgelegt. Bei dieser Einstellung wurde ein Leerwert von 42.7 CPM gemessen und als Konstante von den Meßwerten aller Proben abgezogen. Die Zählzeit betrug 10 Minuten.

Die Quench-Korrektur-Kurve wurde an Hand des Kanalverhältnisses erstellt. Dazu wurde ein Kanal, der Elektronen in den oberen zwei Dritteln des Energiespektrums erfaßt (70 - 170), ins Verhältnis zum gesamten Meßkanal (8 - 170) gesetzt. Daraus ergibt sich für das Kanalverhältnis (SCR):

$$SCR = \frac{\text{Impulse (70 - 170)}}{\text{Impulse (8 - 170)}}$$

Diesen Wert berechnete der Szintillationszähler bei jeder Messung.

Um die Quench-Korrektur-Kurve aufzustellen, wurden Szintillations-Cocktails hergestellt, die eine Aktivität von 26640 DPM, sowie Carbosorb^R und Permaflour^R in den Mischungsverhältnissen, die in Tabelle 1 wiedergegeben sind, enthielten.

Die Zählausbeute ergibt sich aus den Verhältnissen der gemessenen Impulszahl pro Minute (CPM) zur tatsächlichen Aktivität (Zerfälle pro Minute, DPM) und steht in einer linearen Beziehung zum Kanalverhältnis (Abb. 3).

Carbosorb (ml)	Permaflour (ml)	SCR	CPM	Zählausbeute (%)
5	14	0.811	19207.7	72.1
5.5	13.5	0.798	18887.8	70.9
6	13	0.775	19314.0	72.5
6.5	12.5	0.749	18674.6	70.1
7	12	0.720	18434.9	69.2
7.5	11.5	0.680	17502.5	65.7
8	11	0.688	18168.5	68.2
8.5	10.5	0.647	17023.0	63.9
9	10	0.649	16809.8	63.1
9.5	9.5	0.608	16703.3	62.7
10	9	0.496	13373.3	50.2
10.5	8.5	0.499	15078.2	56.6
11	8	0.553	15984.0	60.0
11.5	7.5	0.364	12520.8	47.0
12	7	0.431	13613.0	51.1
12.5	6.5	0.291	10949.0	41.1

Tab. 1: Impulsrate und Zählausbeute für verschiedene Mischungsverhältnisse der Szintillationsreagenzien Carbosorb und Permaflour (Zerfallsrate: DPM = 26640)

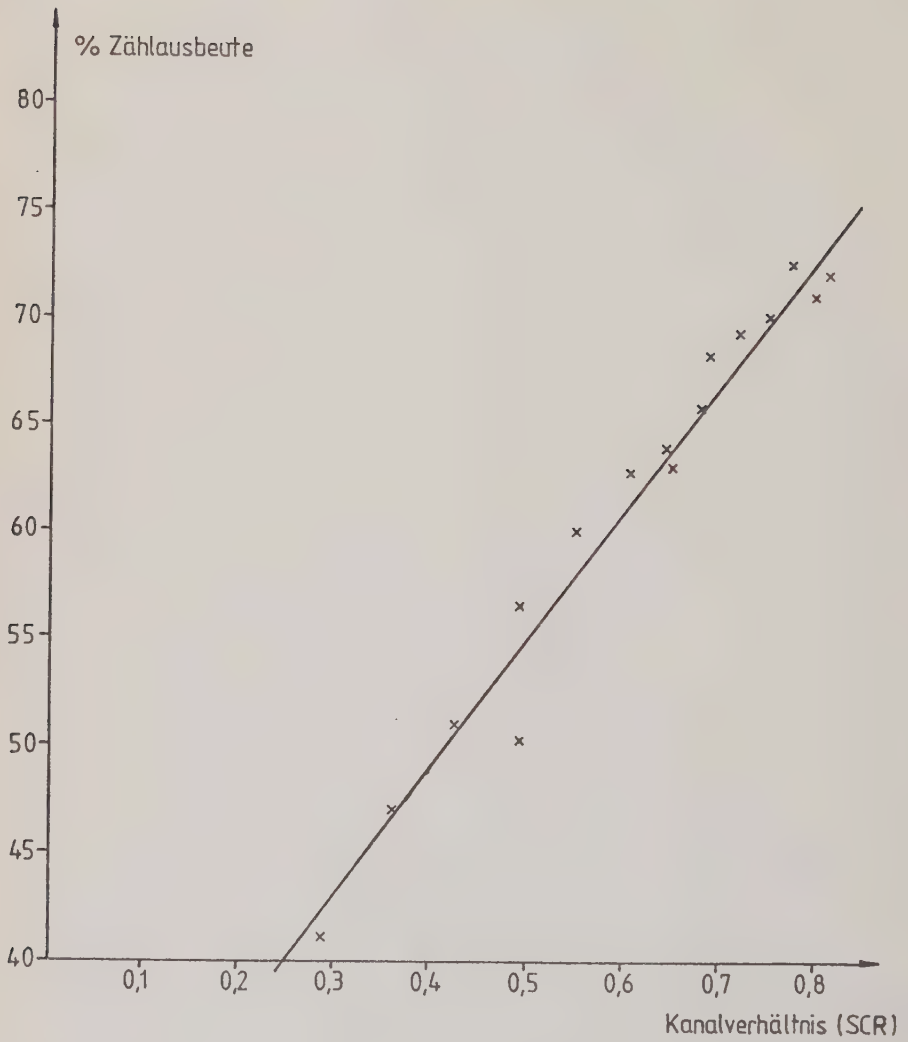


Abb. 3: Quench-Korrektur-Kurve

Durch Regressionsanalyse nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate wurde folgende Gleichung für diese Quench-Gerade gefunden:

$$\text{Zählausbeute} = \frac{\text{Impulsrate}}{\text{Zerfallsrate}} \cdot 100\% = 24.4274 + 60.8224 \cdot \text{SCR}$$

Die Quenchkorrektur wurde danach mit der Formel

$$\text{Zerfallsrate (DPM)} = \frac{\text{Impulsrate (CPM)} \cdot 100}{24.4274 + 60.8224 \cdot \text{SCR}}$$

durchgeführt.

Für die Bienen-Stichproben aus Volk D nach 6, 48 und 96 Stunden mußte zum Ausgleich der Oxidationsausbeuten von 88.8, 85.2 und 87.4% eine zusätzliche Korrektur mit dem Kehrwert der Oxidationsausbeute vorgenommen werden. Dann konnte die Wirkstoffmenge direkt berechnet werden, da 1 µg Wirksubstanz einer Aktivität von 177.6 DPM entspricht.

Anhand des folgenden Beispiels soll der gesamte Rechenweg zusammengefaßt werden.

Probe: Biene aus Volk E, 30 min nach der Behandlung.

$$\text{SCR} = 0.789$$

$$\text{CPM} = 813.2$$

$$\text{Aktivität} = \frac{813.2 \cdot 100}{24.4274 + 60.8224 \cdot 0.789}$$

$$\text{Wirkstoffmenge} = 1122.95 : 177.6 = 6.323 \mu\text{g}$$

3.1.2. Untersuchungen über die Verteilung von markiertem Futter in Bienengruppen

In Laborversuchen wurde der Einfluß verschiedener Faktoren, wie Käfiggröße, Gruppengröße, Zufütterung und Honigblasenfüllung auf die Futterverteilung in Bienengruppen untersucht.

Dabei kam eine Farbstoffmarkierungsmethode mit Methylenblau als Tracer zur Anwendung. Aus einem auf 50% Zuckergehalt verdünnten Invertzuckersirup (API-INVERT^R-Futtersirup 72,7%, Zuckerfabrik Franken GmbH, Ochsenfurt) und kristallinem Methylenblau wurde eine 2%ige Farbstofflösung hergestellt.

Das Methylenblau wurde nach Versuchsende mit Alkohol aus den Bienen extrahiert. Dazu mußte jede Biene in 2.5 ml 96%igem Äthanol mit einem Homogenisierstab (ULTRA-TURRAX^R, IKA-Werk, Janke & Kunkel) zerkleinert und anschließend 10 Minuten lang bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert werden.

Der klare Überstand zeigte eine von gelb über grün bis tiefblau variierende Färbung. Die Extinktion dieses Alkohol-extraktes wurde im Photometer (Zeiss Spektralphotometer PMQ II, Carl Zeiss, Oberkochen/Württemberg) bei Licht von 660 nm Wellenlänge gegen 96%iges Äthanol als Null-Wert gemessen. Proben, die den Meßbereich überschritten, wurden im Verhältnis 1:10 mit 96%igem Äthanol verdünnt.

Die Bestimmung des Anteils an markierter Futterlösung in den Bienen erfolgte anhand einer Eichkurve. Aus der Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe mit 50%iger Invertzuckerlösung angefertigt und von jeder Verdünnungsstufe zweimal je 10 µl in 2.5 ml 96%igem Alkohol gelöst. Die Extinktionen dieser Lösungen gehen aus Tab. 2 hervor. Als Null-Probe diente eine Lösung von 10 µl 50%igem Invertzuckersirup in 2.5 ml Alkohol.

Für die in Abb. 4 dargestellte Eichgerade wurde mittels Regressionsanalyse nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate die Gleichung

$$\text{Extinktion} = 0.0111 + 1.2 \mu\text{l Lösung} \quad \text{gefunden.}$$

Daraus ergibt sich die Formel:

$$\mu\text{l Stammlösung} = \frac{\text{Extinktion} - 0.0111}{1.2}$$

zur Berechnung der Menge an Farblösung in den Bienen in Mikroliter.

(Zusätzlich wurde auch der dekadische Logarithmus dieser Werte berechnet).

Verdünnungsstufe	Anteil Stammlösung ($\mu\text{l}/2.5\text{ml}$ Äthanol)	Extinktion 1. Probe	Extinktion 2. Probe
1 : 4	2.5	2	2
1 : 10	1.0	1.25	1.28
1 : 20	0.5	0.56	0.62
1 : 40	0.25	0.34	0.34
1 : 100	0.1	0.122	0.134
1 : 200	0.05	0.065	0.098
1 : 1000	0.01	0.028	0.022
Null-Probe	0	0.015	0.012

Tab. 2: Verdünnungsstufen und Extinktionswerte für die Eichkurve zur Berechnung der Menge der von den Bienen aufgenommenen Farbstofflösung

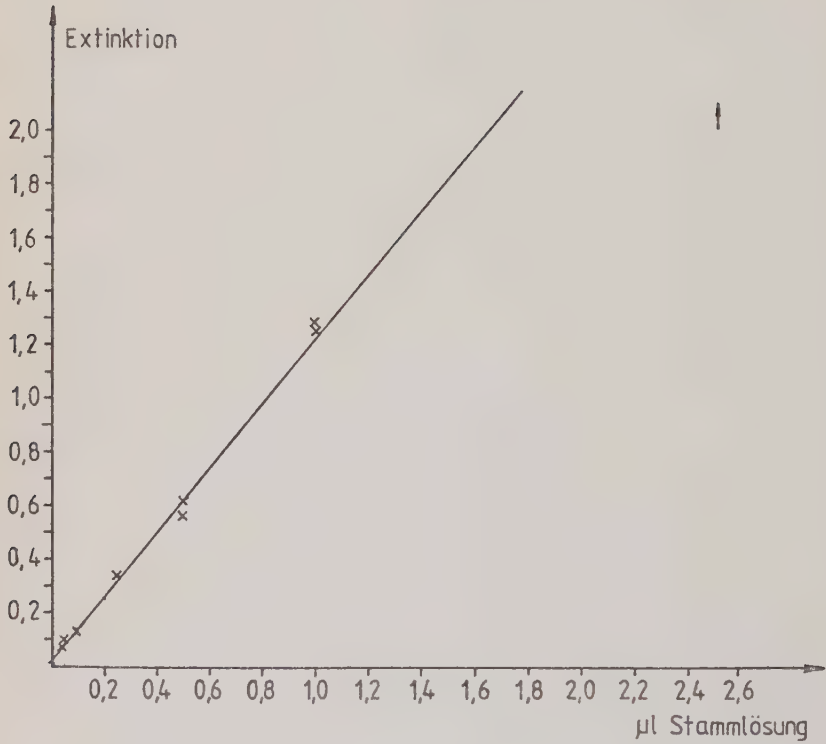


Abb. 4: Eichkurve zur Berechnung der Stammlösungsmenge aus der Extinktion

Die Versuchsbienen waren Arbeiterinnen aus Völkern (*Apis mellifera carnica*) des Tierhygienischen Instituts in Freiburg. Da sich der Versuchszeitraum vom 15. Oktober bis zum 20. Januar erstreckte, handelte es sich durchwegs um Winterbienen.

Die Bienen wurden möglichst rasch von einer zentralen Wabe in ein Holzkästchen abgefedt und entweder sofort durch Einleiten von Kohlendioxyd in dieses Kästchen narkotisiert, oder zwischen Entnahme aus dem Volk und Narkotisierung bis zu 24 Stunden bei Zuckerwasserfütterung gehalten.

Dann konnten sie gezählt und in Versuchsgruppen von 40 oder 80 Individuen eingeteilt werden. 90% der Versuchstiere - die Empfängerbienen - wurden direkt in Versuchskäfige verbracht. Die Spenderbienen - 10% der Versuchsgruppe - wurden später zugesetzt und stammten aus den nach der Gruppeneinteilung übriggebliebenen Bienen.

Alle Bienen blieben vor Versuchsbeginn eine Stunde lang ohne Futter im Brutschrank bei 25°C und 70-75% rel. Luftfeuchtigkeit. Während dieser "Hungerzeit" sollte durch gegenseitigen Futteraustausch eine möglichst gleichmäßige Verteilung des Kropfinhaltes unter allen Bienen erreicht und die Bereitschaft zu einer Futteraufnahme gesteigert werden.

Zehn Prozent der Versuchsbienen - die Spenderbienen - wurden einzeln mit je 10 µl der Stammlösung gefüttert. Die Biene wird dabei mit Daumen und Zeigefinger einer Hand an den Flügeln fixiert, während die andere Hand die Spitze einer Mikroliter-Pipette an ihre Mundwerkzeuge bringt. Bei Benetzung von Mandibeln oder Rüssel mit der Zuckerlösung beginnt die Biene selbst das angebotene Futter aufzusaugen.

Die so gefütterten Bienen wurden in einem kleinen Käfig gesammelt und, wenn sie vollzählig waren, gleichzeitig in den Käfig zu den Empfängerinnen gesetzt. Spenderbienen, die Farblösung vor dem Zusetzen erbrachen, wurden verworfen. Während der Versuchsdauer standen die Gruppen bei 25°C und 70-75% Luftfeuchte im Brutschrank und sollten die markierte Lösung

unter sich verteilen.

Nach Ende der Versuchszeit wurden die Bienen durch Schockgefrieren beim Eintauchen in flüssigen Stickstoff (-196°C) abgetötet und anschließend bei -20°C gelagert oder sofort aufgearbeitet.

Da sich in Vorversuchen der Fütterungszustand vor Versuchsbeginn als starker Einfluß auf das Ausmaß des Futteraustausches erwiesen hatte, wurde er anhand des Gewichts der Honigblase - des Kropfes der Bienen - ermittelt.

Dazu wurden jeweils vor und nach den Einzelfütterungen für eine Gruppenserie ca. 20 Bienen aus der Restgruppe, aus der auch die Spenderbienen stammten, in Alkohol getötet. Von jeder dieser etwa 40 Bienen wurde der herauspräparierte Kropf gewogen. Das Maß für den Fütterungszustand - das durchschnittliche Honigmagengewicht - wurde als arithmetisches Mittel der Werte dieser Stichprobe errechnet.

Für jede Fragestellung wurden 6 Parallelansätze durchgeführt. Alle Bienen für je einen Ansatz stammten aus der gleichen Gruppe, so daß ihr Fütterungszustand als gleich gelten kann.

Da hier eine Farbstoffmarkierungsmethode zur Anwendung kam, sollte zunächst abgeklärt werden, inwieweit die Markierungsmethode die Ergebnisse beeinflußt. Dazu wurden unter ansonsten gleichen Bedingungen die Verteilung einer Zuckerlösung mit dem radioaktiv markierten Akarizid und die einer mit Methylenblau gefärbten Zuckerlösung verglichen. Der Vergleich wurde mit je 40 Bienen und Verteilungszeiten von 1 Stunde (ohne Zufütterung) und 6 Stunden (mit 50%iger Zuckerlösung zur freien Aufnahme) durchgeführt.

Als radioaktive Lösung diente 1 ml 50%ige Invertzuckerlösung mit $3.24 \mu\text{Ci}$ (119.9 kBq) entsprechend 7480740 DPM Radioaktivität und 6.95 ng Reinsubstanz des Akarizids. Ein Mikroliter dieser Lösung enthielt also eine Radioaktivität

von 7481 DPM.

Die Messung der Radioaktivität erfolgte nach Verbrennung der einzelnen Bienen im TRI-CARB^R-Sample-Oxidizer durch Flüssigkeitsszintillationszählung mit Quench-Korrektur wie unter 3.1.1. beschrieben. Aus der Formel:

$$\mu l = \frac{\text{gemessene Zerfallsrate}}{7481 \text{ DPM}}$$

ergab sich der von den Bienen aufgenommene Anteil an der markierten Lösung.

Um festzustellen, ob die Dichte der Bienen im Versuchskäfig Einfluß auf die Intensität der Futterweitergaben hat, wurden je 40 Bienen in 3 verschieden großen Käfigen gehalten. Im größten Käfig, der Innenmaße von 9.9 x 8.8 x 7.9 cm hatte, standen 17.2 cm³ pro Biene zur Verfügung. In einem sogenannten "Liebefelder Käfig" mit 8.3 cm Breite, 6.5 cm Höhe und 3.8 cm Tiefe stand jeder Biene 5.1 cm³ Raum zur Verfügung, während sie im kleinsten Kästchen (Innenmaße 5.7 x 4.0 x 3.4 cm) nur 1.9 cm³ Platz hatte.

Die übrigen Versuchsbedingungen waren konstant: 1 Stunde Versuchsdauer, keine zusätzliche Fütterung.

Da Unklarheit besteht, ab welcher Individuenzahl Bienen ihr typisches Sozialverhalten mit Futteraustausch zeigen, wurde die Futterverteilung in Gruppen mit 40 und 80 Bienen untersucht. Die Käfige für 40 Bienen maßen 5.7 x 4.0 x 3.4 cm, während 80 Bienen in doppelt so großen Käfigen (5.7 x 8.0 x 3.4 cm) gehalten wurden. Pro Biene war also in beiden Fällen 1.9 cm³ Raum vorhanden.

Die Versuchsdauer betrug wieder 1 Stunde und es wurde kein Futter angeboten.

Es sollte außerdem überprüft werden, welchen Einfluß zusätzliche Futterquellen auf die Verteilung der markierten

Zuckerlösung haben. Deswegen wurde den Bienen während der Verteilungszeit Invertzuckerlösung so angeboten, daß sie durch ein kleines Loch beliebige Mengen mit dem Rüssel aufnehmen konnten. Drei Versuchsgruppen, denen Lösungen mit Zuckerkonzentrationen von 20, 50 und 70% zur Verfügung standen, wurden mit einer Kontrollgruppe ohne Futterlösung verglichen.

Die Verteilung der Farblösung wurde an Gruppen von 40 Bienen in einem Liebefelder Käfig ($5.1 \text{ cm}^3/\text{Biene}$) während einer Stunde Versuchsdauer untersucht.

Um den Einfluß der Honigblasenfüllung der Bienen festzustellen, wurden Bienengruppen mit gleichen Versuchsbedingungen, wie Platzangebot, Gruppengröße, Verteilungszeit und Zufütterung, aber unterschiedlichem durchschnittlichen Honigmagengewicht ausgewählt und die Verteilung der markierten Lösung bei ihnen verglichen.

3.1.3. Untersuchungen über die Verteilung des Akarizids im Bienenkörper

Die Bienen für diese Versuchsreihe waren Stockbienen aus einem Volk von *Apis mellifera carnica* (Volk Thiele 24 E). Sie wurden vormittags zwischen 8.30 und 10.00 Uhr möglichst rasch von einer Brutwabe in ein Holzkästchen gefegt. Zwischen Entnahme und Versuchsbeginn blieben sie mindestens eine Stunde ohne Futter bei Zimmertemperatur stehen.

Zur Herstellung der radioaktiven Medikamentenlösung wurden 3.0 mg Reinsubstanz CGA-50439 mit einer spezifischen Aktivität von 34.7 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ (1.284 MBq/mg) in 1 ml 0.5-molarer Salzsäure gelöst. 190 μl dieser Lösung - entsprechend 19.78 μCi (0.732 MBq) und 0.57 mg Reinsubstanz - wurden mit der nicht-radioaktiven Komponente vermischt.

Dieser "kalte" Anteil bestand aus 16.0 mg der granulierten Formulierung "Apitol^R-G15" (2.4 mg Reinsubstanz) und 30%iger wässriger Saccharoselösung ad 3.0 ml.

In diesen 3 ml Akarizidlösung waren also 2.97 mg reine Wirksubstanz und 19.78 μCi (0.732 MBq) Radioaktivität enthalten, so daß eine Einzeldosis von 10 μl einer Wirkstoffmenge von 9.9 μg und einer Aktivität von 65.9 μCi (2.439 kBq) bzw. 146340 Zerfällen pro Minute (DPM) entspricht.

Für jede Versuchsgruppe wurden einzeln an 30 Bienen mit einer Eppendorf-Pipette je 10 μl Akarizidlösung verfüttert. Anschließend wurden die Bienen in Einzelkäfigen gehalten (Kunststoff-Lockenwickler, Durchmesser 1.5 cm, Länge 5.0 cm), die mit einem reiskorngroßen Klümpchen Zucker-Futtermittel versehen waren. Diese Käfige wurden mittels einer Lochplatte in einem Exsikkator so aufgestellt, daß die Bienen keinen Kontakt zueinander haben konnten (Abb. 5). Im Exsikkator wurden bei einer Temperatur von 25°C 70-80% rel. Luftfeuchte aufrechterhalten.

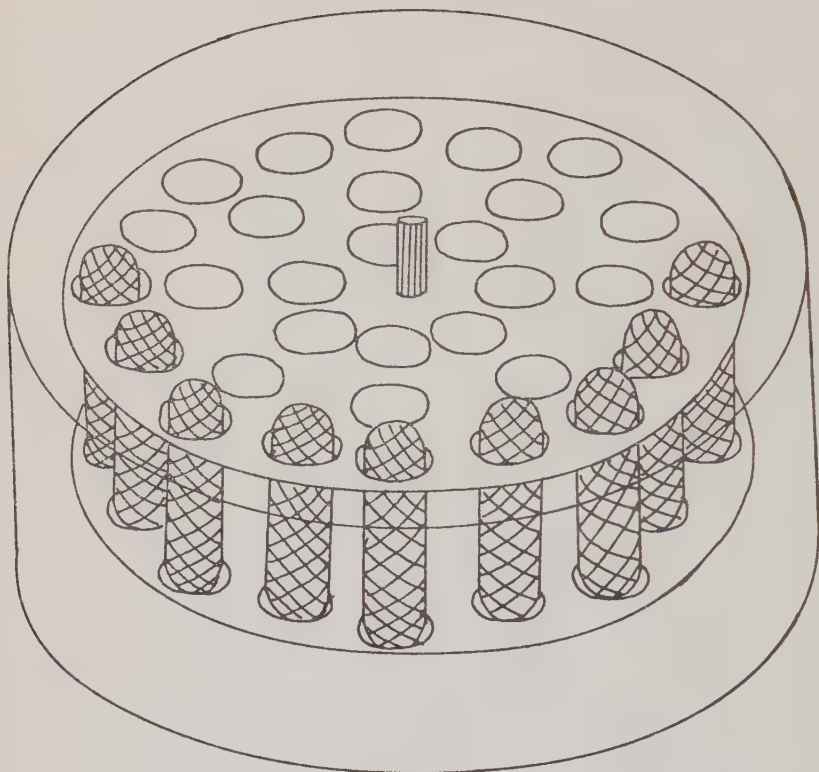


Abb. 5: Schematische Skizze des Inkubationsgefäßes zur Haltung einzelner Bienen (Erklärung siehe Text)

Um eine mögliche Kontamination der Umgebung mit Kohlenstoff-14 zu vermeiden, wurde die Abluft durch eine CO₂-adsorbierende Säule gesaugt (SODASORB-Atemkalk für Narkosegeräte der Firma ICI-Pharma, Plankstadt). Es konnte jedoch keine Radioaktivität im Atemkalk nachgewiesen werden.

Nach Inkubationszeiten von 30 Minuten, 1, 2, 4, 6, 12 und 24 Stunden wurden die noch lebenden Versuchstiere durch kurzes Eintauchen in flüssigen Stickstoff (-196°C) abgetötet und bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

Nach dem Auftauen der Versuchsbienen wurden jeweils 4 bis 5 Organproben entnommen, nämlich 0.5 bis 4 μl Hämolymphe, der gesamte Honigmagen, sowie der übrige Verdauungstrakt und die Giftblase oder der gesamte Stachelapparat. In Einzelfällen gelangte auch die Flugmuskulatur zur Untersuchung. Diese Proben wurden zur weiteren Aufarbeitung durch Oxidation in Combusto-Cones mit saugfähigen Papierkissen (Combusto-Pads, Firma Packard, Best.-Nr. 5067034) überführt.

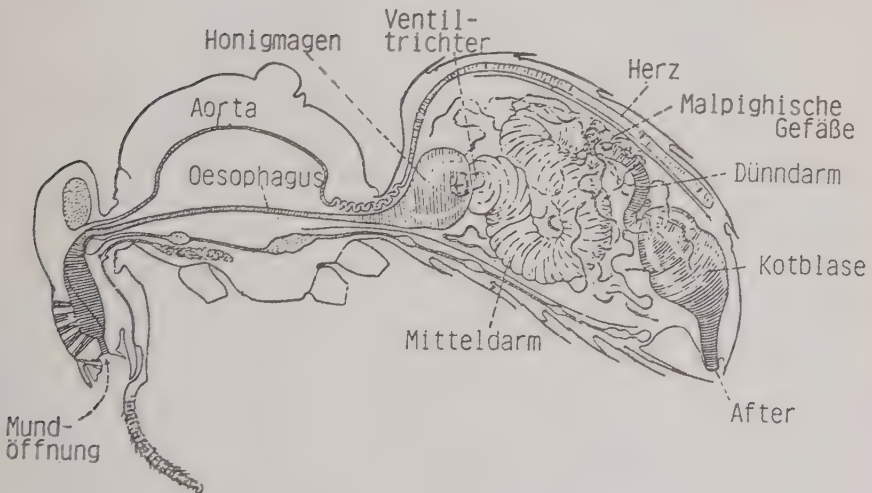


Abb. 6: Querschnitt durch eine Honigbienen-Arbeiterin (modifiziert nach Snotgrass, 1963)

Zur Entnahme von Hamolymphe beugt man den Kopf der Biene bei fixiertem Bruststück soweit zur Thorax-Unterseite, daß die hautige Verbindung zwischen Kopf und Thorax freiliegt. Durch einen kleinen Einstich in diese Haut tritt bei leichter Kompression des Thorax ein Tropfen Hamolymphe aus, der mit einer geeichten Mikroliter-Kapillare (Duran[®] ringcaps, Code-Nr. 9600105, Firma Hirschmann Laborgeräte) aufgesaugt werden kann. Nach Bestimmung der Menge mit einem auf 0.1 μ l unterteilten Maßstab läßt man die Kapillare auf das Papierkissen auslaufen.

Der Kropf oder Honigmagen der Biene liegt im vorderen Teil der Abdominalhöhle (Abb. 5) und ist leicht zugänglich, wenn man den Hinterleib zwischen den Sterniten II und III durch Auseinanderziehen öffnet. Bei weiterem Auseinanderziehen trennt sich die Honigblase selbständig auf Höhe des Ventil-trichters vom Mitteldarm, dem eigentlichen Magen, so daß beide Abschnitte des Verdauungstraktes durch ihre Ventile verschlossen bleiben. Die Speiseröhre kann man unter gleichzeitigem Abklemmen des Honigmagens mit einer spitzen Pinzette abreißen. Beim Herausheben lösen sich die anhaftenden Malpighischen Gefäße leicht vom Kropf ab.

Stachelapparat und Kotblase sind am leichtesten vom hinteren Ende des Abdomens zugänglich (Abb. 5). Erfast man mit senkrecht zur Körperachse gehaltener Pinzette die hinterste Bauch- und Rückenschuppe, so lassen sich bei langsamem Zug Kotblase und Darm, sowie der Stachelapparat, von der Chitinhülle des Abdomens trennen. Die beiden Abdominalschuppen und den Stachelapparat kann man einfach abpräparieren, während die Malpighischen Gefäße nicht vollständig vom Darmtrakt zu entfernen sind.

Wenn sich Kotspuren am Käfig der Biene finden ließen, die darauf hindeuteten, daß die Biene während der Versuchszeit ihre Kotblase entleert hatte, wurde diese Probe verworfen.

Um die Giftblase vom übrigen Stachelapparat zu trennen, ist es zweckmäßig, das ganze Organ auf dem Rand des Probengefäßes

(Combusto-Cone) möglichst lang zu strecken. So gelingt es, den Hals der Giftblase deutlich darzustellen, um ihn dann mit dem Skalpell durchzutrennen. Dabei entleert sich der Inhalt der Giftblase und wird von der Unterlage aufgesaugt.

In den Fällen, in denen die Streckung des Stachelapparates nicht gelang, oder wenn Bienengift die übrigen Teile des Organs kontaminierte, wurde der gesamte Stachelapparat zur Untersuchung herangezogen und der entsprechende Meßwert gesondert aufgeführt.

Von einzelnen Bienen wurde Flugmuskulatur entnommen. Dazu öffnet man die Thorax-Kapsel seitlich am Flügelansatz und kann dann die deutlich abgesetzten Muskelbäuche von der Innenseite der Rückenschuppe abpräparieren. Anschließend wurde das Frischgewicht der Muskelproben bestimmt.

Auf den Bienen sitzende, sowie abgefallene Milben wurden ebenfalls auf Radioaktivität untersucht.

Um eine methodisch bedingte Kontamination von Bienen und Organproben mit Radioaktivität zu überwachen, wurden pro Versuchsgruppe 6 Bienen mit 30%iger Zuckerlösung gefüttert und während der Inkubationszeit ebenfalls einzeln im gleichen Raum neben den Versuchstieren gehalten. Drei dieser Kontrollbienen ergaben jeweils als Ganzes eine Probe (Inkubations-Kontrolle), während von den drei übrigen Bienen die beschriebenen Proben entnommen wurden (Präparations-Kontrolle). Die Werte für die Präparations-Kontrollen lagen in allen Fällen im Bereich des Hintergrundrauschens. Bei den Inkubations-Kontrollen kam nach 2 und 4 Stunden jeweils einmal und nach 12 Stunden dreimal meßbare, wenn auch geringe, Radioaktivität vor.

Die Wirkstoffmenge wurde durch Messung der Radioaktivität über Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt, wie unter 3.1.1. beschrieben.

Auch die Aufarbeitung erfolgte durch Oxidation im TRI-CARB^R-Sample-Oxidizer. Für Organproben war eine Verbrennungszeit von 10 Sekunden ausreichend, während die Verbrennung einer ganzen Biene 22 Sekunden erforderte.

Bei Überprüfung der Oxidationsausbeute ergaben sich Ausbeuten unter 95% für die Gruppen mit 2 Stunden (89.1%), 4 Stunden (93.0%) und 6 Stunden (93.6%) Versuchsdauer. Die Aktivitätswerte für diese Gruppen wurden mit einem Korrekturfaktor (Kehrwert der Oxidationsausbeute) multipliziert. In den übrigen Fällen konnte eine Korrektur unterbleiben.

Bei der Flüssigkeitsszintillationszählung betrug die Zählzeit allgemein 10 Minuten, wurde jedoch für die Hämolympheproben mit 6, 12 und 24 Stunden Versuchsdauer auf 30 Minuten verlängert. So konnte auch für diese Proben mit geringer Radioaktivität eine ausreichend genaue Messung erreicht werden (statist. Fehler < 5%).

In der verfütterten Akarizidmenge entsprach 1 µg Wirkstoff einer Aktivität von 14785 DPM. Aus diesem Verhältnis ließ sich die Wirkstoffmenge in den einzelnen Proben direkt berechnen.

An einer Hämolympheprobe von 4.0 µl nach 2 Stunden Versuchsdauer (89.1% Oxidationsausbeute) soll der Rechenweg beispielhaft demonstriert werden:

Meßdaten: SCR = 0.751 Impulsrate = 845.6 CPM

$$\text{Zerfallsrate} = \frac{845.6 \cdot 100}{24.4274 + 60.8224 \cdot 0.751} = 1206.19 \text{ DPM}$$

Aktivität unter Berücksichtigung der Oxidationsausbeute:

$$1206.19 \text{ DPM} : 0.891 = 1353.1 \text{ DPM}$$

In 1 µl Hämolymphe sind demnach 23 ng Wirkstoff enthalten.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Ergebnisse der Untersuchungen über die Verteilung und Wirkung des Akarizids in Bienenvölkern

Zur Überprüfung der verabreichten Dosis wurde die Volkstärke nach Versuchsende durch Wiegen der Bienen bestimmt. Die tatsächliche Volkstärke, sowie die durchschnittliche Dosis pro Biene gehen aus Tab. 3 hervor. Ursprünglich war eine Dosierung von 10 µg/Biene geplant. Die Abweichung von dieser Dosis beträgt im Durchschnitt 18%, wobei Volk E eine Überdosis von 34% erhielt.

Volk	geschätzte Volkstärke (n Bienen)	gemessene Volkstärke (n Bienen)	durchschn. Dosis (µg Wirkstoff pro Biene)
A	6750	6030	11.8
B	5250	5930	8.8
C	5250	6010	8.7
D	4500	5900	7.6
E	7500	5600	13.4
F	6000	6870	8.7

Tab. 3: Vergleich der Ergebnisse von Schätzung und Messung der Volkstärke, sowie die tatsächliche durchschnittliche Dosierung

Die Bestimmung der Wirkstoffmenge in den Einzelbienen der zu verschiedenen Zeiten entnommenen Stichproben sollte Aufschluß über die Dynamik der Verteilung geben. Zur besseren Übersicht wurden die Bienen einer Stichprobe entsprechend der in ihnen gefundenen Wirkstoffmenge 10 verschiedenen Klassen mit einer Breite von jeweils $2.0 \mu\text{g}$ zugeteilt. In einer 11. Klasse wurden Bienen mit mehr als $20 \mu\text{g}$ Wirkstoff zusammengefaßt.

Die Ergebnisse der Wintervölker im Kühlraum (A und B), sowie im Freien (C und D), sind jeweils zusammengefaßt dargestellt (Tab. 4 und 5). Da die beiden Sommervölker (E und F) starke Abweichungen voneinander aufwiesen, wurden sie getrennt betrachtet (Tabb. 6, 7a, 7b).

In den Abb. 7 und 8 sind die Häufigkeitsdiagramme und in Tab. 4 bis 7 die Medianwerte der Stichproben in Zeitabständen von 30 Minuten bis 96 Stunden nach der Behandlung wiedergegeben.

Zu Beginn der Versuchszeit hatte der größte Teil der Bienen geringe Wirkstoffmengen aufgenommen (0 bis $4 \mu\text{g}$). Mit zunehmender Zeitdauer veränderten sich die Häufigkeitsverteilungen. Dabei nahm der Anteil an Bienen mit größeren Wirkstoffmengen zu. Die Veränderung der Häufigkeitsverteilung erwies sich im Mediantest (Siegel, 1976) von Probenahme zu Probenahme nur in seltenen Fällen als signifikant. Über größere Zeitabstände waren die Unterschiede jedoch signifikant.

In den Völkern A und B unterschied sich die Verteilung 6 Stunden nach der Behandlung signifikant von der nach 30 Minuten ($p = 0.025$). Für die Völker C und D sowie F war die Verteilung nach 4 Stunden ($p = 0.025$ bzw. 0.005) und für Volk E nach 2 Stunden ($p = 0.005$) signifikant verschieden von der Verteilung in der ersten Stichprobe.

Die Stichproben nach 12 Stunden zeigten bei allen Völkern wiederum signifikant andere Verteilungen als bei den oben genannten Proben ($p \leq 0.05$).

Klassen (µg Wirkstoff/Biene)													Median
Zeit: n	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-14	14-16	16-18	18-20	20		
30 min.: n=17 %	8 47.0	4 23.5	2 11.8	1 5.9		1 5.9				1 5.9		2.55	
1 Std.: n=39 %	14 35.9	10 25.6	5 12.8	5 12.8	1 2.6		2 5.1				2 5.1	2.88	
2 Std.: n=43 %	15 34.9	11 25.6	6 14.0	4 9.3	4 9.3	3 7.0						3.22	
4 Std.: n=44 %	18 40.9	9 20.4	11 25.0	3 6.8			1 2.3	1 2.3			1 2.3	3.085	
6 Std.: n=56 %	10 17.8	12 21.4	8 14.3	10 17.8	6 10.7	3 5.4		3 5.4	2 3.6	1 1.8	1 1.8	5.48	
12 Std.: n=58 %	11 19.0	16 27.6	13 22.4	9 15.5	4 6.9	3 5.2	1 1.7				1 1.7	4.185	
24 Std.: n=58 %	5 8.6	19 32.8	6 10.3	9 15.5	6 10.3	7 12.1	2 3.4	3 5.2			1 1.7	5.555	
48 Std.: n=50 %	3 6.0	7 14.0	11 22.0	9 18.0	10 20.0	3 6.0	1 2.0	1 2.0	1 2.0	1 2.0	3 6.0	6.50	
96 Std.: n=58 %	5 8.6	11 19.0	7 12.1	12 20.7	6 10.3	3 5.2	4 6.9	2 3.4	1 1.7	1 1.7	6 10.3	7.20	

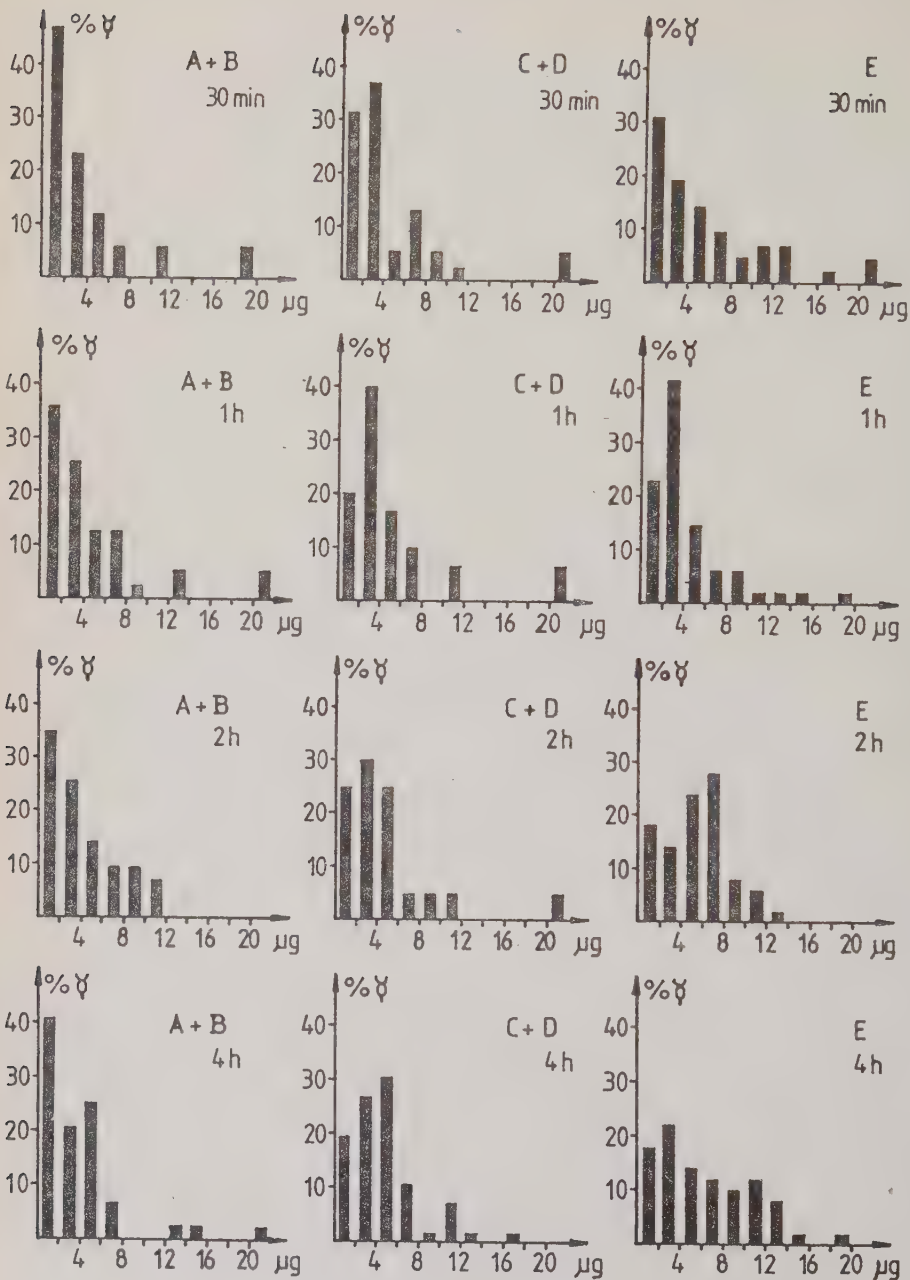
Tab. 4: Häufigkeitstabelle: Zeitabhängige Verteilung des Wirkstoffs bei Wintervölkern im Kühlraum (Voik A + B)

Klassen (μg Wirkstoff/Biene)													Median
Zeit: n	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-14	14-16	16-18	18-20	20		
30 min.: n=38 %	12 31.6	14 36.8	2 5.3	5 13.2	2 5.3	1 2.6					2 5.3	2.72	
1 Std.: n=30 %	6 20.0	12 40.0	5 16.7	3 10.0		2 6.7					2 6.7	3.08	
2 Std.: n=20 %	5 25.0	6 30.0	5 25.0	1 5.0	1 5.0	1 5.0					1 5.0	3.52	
4 Std.: n=56 %	11 19.6	15 26.8	17 30.4	6 10.7	1 1.8	4 7.1	1 1.8		1 1.8			4.31	
6 Std.: n=58 %	9 15.5	16 27.6	7 12.1	11 19.0	8 13.8	3 5.2	1 1.7	2 3.4			1 1.7	4.85	
12 Std.: n=56 %	5 9.8	12 23.5	13 25.5	9 17.6	8 15.7	3 5.9	1 2.0	2 3.9	1 2.0		2 3.9	5.72	
24 Std.: n=60 %	5 8.3	21 35.0	16 26.7	7 11.7	5 8.3	4 6.7	1 1.7				1 1.7	4.65	
48 Std.: n=54 %	3 5.6	15 27.8	10 18.5	10 18.5	8 14.8	4 7.4	1 1.8		1 1.8		2 3.7	5.34	
96 Std.: n=60 %	4 6.7	7 11.7	15 25.0	9 15.0	4 6.7	5 8.3	8 13.3	2 3.3	2 3.3	1 1.7	3 5.0	6.94	

Tab. 5: Häufigkeitstabelle: Zeitabhängige Verteilung des Wirkstoffs bei Wintervölkern im Freien (Volk C + D)

Zeit: n		Klassen (µg Wirkstoff/Biene)											Median
		0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-14	14-16	16-18	18-20	20	
30 min.: n=42	%	13 31.0	8 19.0	6 14.3	4 9.5	2 4.8	3 7.1	3 7.1		1 2.4		2 4.8	4.234
1 Std.: n=48	%	11 22.9	20 41.7	7 14.6	3 6.2	3 6.2	1 2.1	1 2.1	1 2.1		1 2.1		3.078
2 Std.: n=50	%	9 18.0	7 14.0	12 24.0	14 28.0	4 8.0	3 6.0	1 2.0					5.514
4 Std.: n=50	%	9 18.0	11 22.0	7 14.0	6 12.0	5 10.0	6 12.0	4 8.0	1 2.0		1 2.0		4.792
6 Std.: n=50	%	7 14.0	14 28.0	9 18.0	4 8.0	8 16.0	1 2.0	1 2.0	1 2.0	1 2.0	3 6.0		4.672
12 Std.: n=50	%	6 12.0	5 10.0	11 22.0	8 16.0	8 16.0	6 12.0	3 6.0	1 2.0		2 4.0		6.242
24 Std.: n=50	%	5 10.0	8 16.0	7 14.0	11 22.0	5 10.0	4 8.0	3 6.0	3 6.0	1 2.0	2 4.0	1 2.0	7.200
48 Std.: n=52	%	3 5.8	6 11.5	6 11.5	8 15.4	8 15.4	4 7.7	7 13.5	3 5.8	3 5.8	2 3.8	2 3.8	9.253
96 Std.: n=45	%	8 17.8	9 20.0	6 13.3	5 11.1	2 4.4	5 11.1	3 6.7	3 6.7	1 2.2	1 2.2	2 4.4	5.941

Tab. 6: Häufigkeitstabelle: Zeitabhängige Verteilung des Wirkstoffs im Sommervolke



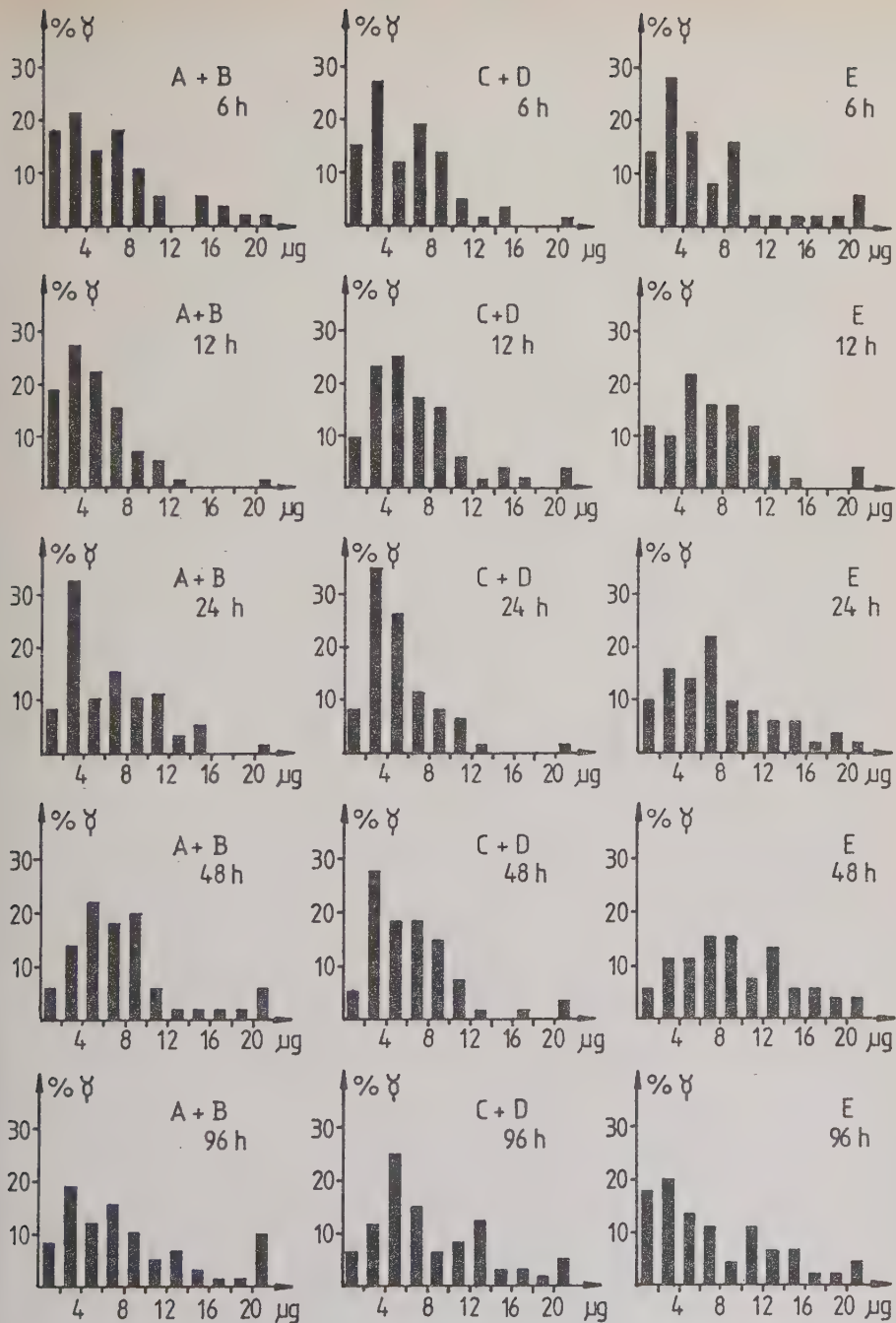


Abb. 7: Zeitliche Veränderung der Verteilung des Wirkstoffs in den Völkern A - E (Häufigkeitsdiagramme mit einer Klassenbreite von 2 µg Wirkstoff)

Zeit: $\dot{n}$	Klassen (μg Wirkstoff/Biene)											Median
	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-14	14-16	16-18	18-20	20	
30 min.: n=50 %	36 72.0	7 14.0		4 8.0		1 2.0		1 2.0			1 2.0	0.718
1 Std.: n=50 %	41 82.0	5 10.0	3 6.0		1 2.0							0.765
2 Std.: n=19 %	12 63.1	5 26.3		1 5.3							1 5.3	1.307
4 Std.: n=43 %	27 62.8	5 11.6	7 16.3	1 2.3	3 7.0							1.483
6 Std.: n=48 %	22 45.8	17 35.4	5 10.4	1 2.1	1 2.1	2 4.2						2.236
12 Std.: n=50 %	35 70.0	9 18.0	4 8.0			1 2.0				1 2.0		1.312
24 Std.: n=50 %	33 66.0	6 12.0	3 6.0	1 2.0	4 8.0				1 2.0	2 4.0		1.350
48 Std.: n=50 %	21 42.0	14 18.0	5 10.0	6 12.0	3 6.0				1 2.0			2.698
96 Std.: n=50 %	18 36.0	15 30.0	6 12.0	4 8.0	5 10.0	1 2.0		1 2.0				2.350

Tab. 7a: Häufigkeitstabelle: Zeitabhängige Verteilung des Wirkstoffs im Sommervolk F (Klassenbreite 2 μg Wirkstoff)

Zeit: n	Klassen (µg. Wirkstoff/Biene)										Median
0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	10	
30 min.: n=50 %	34 68.0	2 4.0	2 4.0	5 10.0		3 6.0	2 4.0			3 6.0	0.718
1 Std.: n=50 %	29 58.0	12 24.0	3 6.0	2 4.0	2 4.0	1 2.0		1 2.0			0.765
2 Std.: n=19 %	7 36.8	5 26.3	3 15.8	2 10.5		1 5.3				1 5.3	1.307
4 Std.: n=43 %	17 39.5	10 23.3	2 4.6	3 6.9	3 6.9	4 9.2	1 2.3	2 4.6	1 2.3		1.483
6 Std.: n=48 %	10 20.8	12 25.0	9 18.8	8 16.6	4 8.4	1 2.1	1 2.1		1 2.1	2 4.2	2.236
12 Std.: n=50 %	19 38.0	16 32.0	4 8.0	5 10.0	2 4.0	2 4.0				2 4.0	1.312
24 Std.: n=50 %	21 42.0	12 24.0	2 4.0	4 8.0	3 6.0		1 2.0	1 2.0	3 6.0	3 6.0	1.350
48 Std.: n=50 %	13 26.0	8 16.0	7 14.0	7 14.0	2 4.0	3 6.0	3 6.0	2 4.0	1 2.0	1 2.0	2.698
96 Std.: n=50 %	7 14.0	11 22.0	12 24.0	3 6.0	5 10.0	1 2.0	2 4.0	2 4.0	3 6.0	2 4.0	2.350

Tab. 7b: Häufigkeitstabelle: Zeitabhängige Verteilung des Wirkstoffs im Sommervolk F
(Klassenbreite 1 µg Wirkstoff)

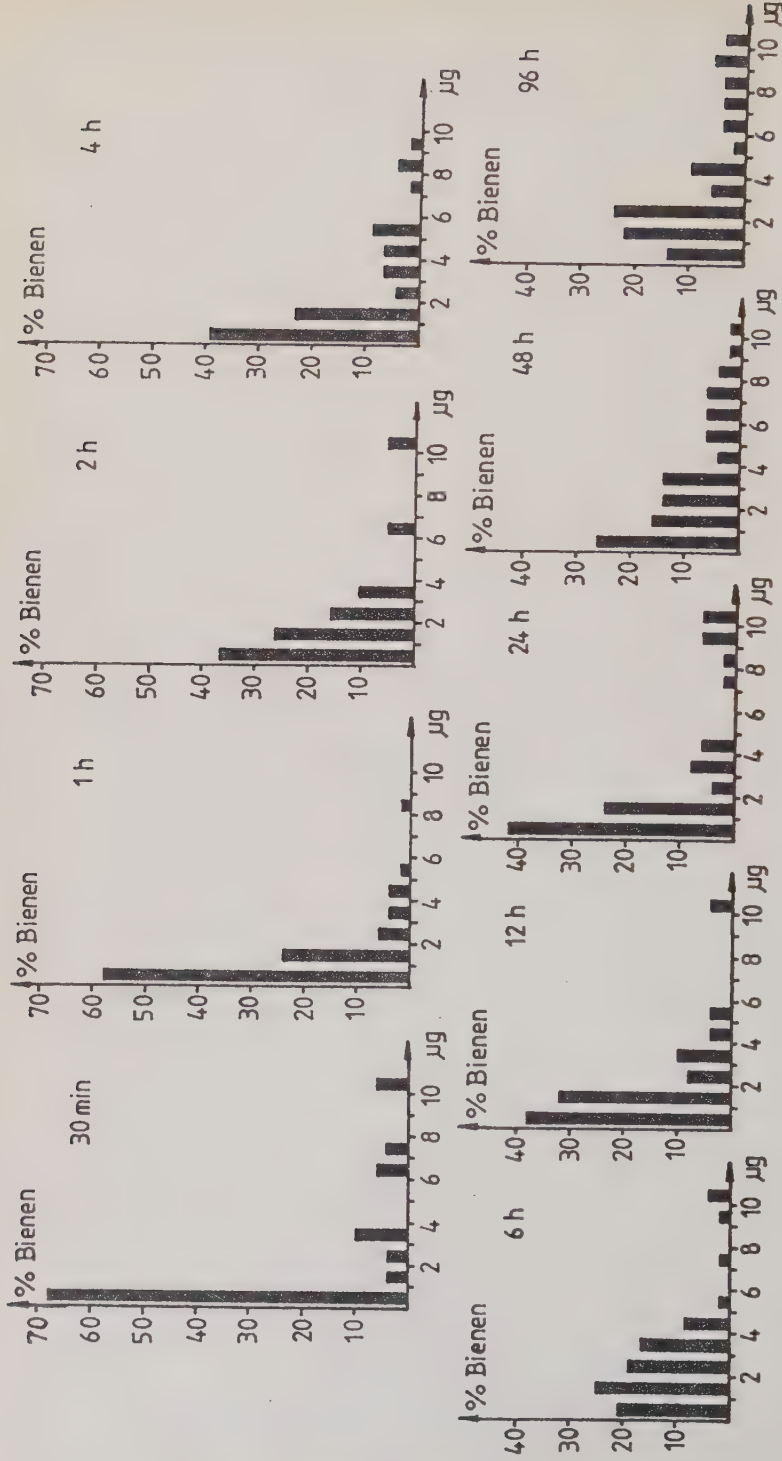


Abb. 8: Zeitliche Veränderung der Verteilung des Wirkstoffs im Volk F (Häufigkeitsdiagramme mit einer Klassenbreite von 1 µg Wirkstoff)

Nach 12 Stunden und später zeigen die Häufigkeitsdiagramme der Völker A bis E eingipflige, mehr oder weniger symmetrische, Kurven. Eine Normalverteilung ist für die Stichproben nach 12 Stunden aus den Wintervölkern und Volk E, sowie nach 24 und 48 Stunden aus Volk E, im Kolmogoroff-Smirnoff-Test auf Anpassung (Sachs, 1984), nicht auszuschließen.

Für die Häufigkeitsverteilung der Stichprobe nach 96 Stunden aus Volk E läßt sich eine Normalverteilung bei 20%iger Irrtumswahrscheinlichkeit ausschließen. Mit 10%iger Irrtumswahrscheinlichkeit läßt sich auch ein signifikanter Unterschied zur Stichprobe nach 48 Stunden feststellen.

Die Wirkstoffmengen in Bienen aus Volk F liegen bei allen Stichproben niedriger als für die übrigen Versuchsvölker (Tab. 7a). Um die Veränderung der Häufigkeitsverteilung darzustellen, wurde daher eine Einteilung mit einer Klassenbreite von 1.0 µg und 11 Klassen vorgenommen (Tab. 7b). Abb. 8 zeigt, daß auch hier der Anteil an Bienen mit größeren Wirkstoffmengen zunahm.

Mit zunehmendem Anteil an Bienen, die größere Mengen an CGA-50439 aufgenommen hatten, erhöhten sich auch die Medianwerte der Stichproben (Abb. 9, Tab. 8). Für die Wintervölker war ein zunächst steilerer und ab 12 Stunden flacherer Anstieg der Stichprobenmediane zu verzeichnen, bis nach 96 Stunden das Maximum von 7.2 µg/Biene im Kühlraum (entsprechend 69.9% der errechneten mittleren Dosis), bzw. 6.94 µg/Biene im Freiland (85.2% der Durchschnittsdosis), erreicht war.

Im Sommer stiegen die Medianwerte der Stichproben aus Volk E innerhalb von 48 Stunden auf 9.25 µg/Biene (= 69.0% der errechneten Durchschnittsdosis) an. Bis 96 Stunden nach der Behandlung sank der Medianwert auf 5.94 µg/Biene.

In Stichproben aus Volk F lag der höchste Medianwert bei 2.69 µg/Biene (30.9% der Durchschnittsdosis) nach 48 Stunden. Auch hier nahmen innerhalb der ersten 6 Stunden die Medianwerte zu, blieben jedoch auf einem viel niedrigerem Niveau.

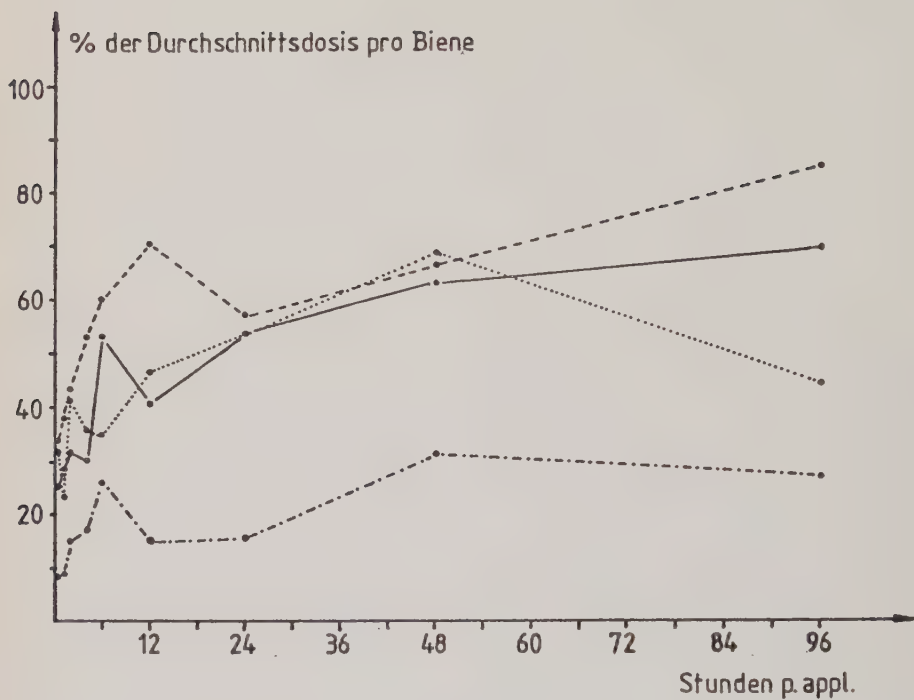


Abb. 9: Relative Medianwerte verschiedener Stichproben in Abhängigkeit von der Zeit nach der Applikation (errechnete Durchschnittsdosis = 100%)

Zeit p. appl.	Winter (Kühlraum) % d. Ø-Dosis	Winter (Freiland) % d. Ø-Dosis	Sommer (Volk E) % d. Ø-Dosis	Sommer (Volk F) % d. Ø-Dosis
30 min	24.8	33.4	31.6	8.3
1 h	28.0	37.8	23.0	8.8
2 h	31.3	43.2	41.1	15.0
4 h	29.9	52.9	35.7	17.0
6 h	53.2	60.0	34.8	25.7
12 h	40.6	70.2	46.6	15.0
24 h	54.0	57.0	53.7	15.5
48 h	63.1	65.5	69.0	30.9
96 h	69.9	85.2	44.3	27.0

Tab. 8: Verhältnis von Medianwert der Akarizidmenge in Bienen-Stichproben und errechneter Durchschnittsdosis (= 100%) zu verschiedenen Zeiten nach der Applikation

Um festzustellen, ob das Absterben von Bienen nach der Behandlung durch eine Überdosis des Akarizids verursacht wird, wurde auch im Totenfall der Wintervölker E und F der Wirkstoffgehalt bestimmt.

Der höchste bei einer lebenden Biene gemessene Wert lag bei 41.3 µg (48 Stunden nach der Behandlung). Dieser Wert wurde lediglich von 5 Bienen aus dem Totenfall beider Völker (110 Bienen) mit 68.2 µg nach 30 Minuten und 100.7, 80.2, 62.6 und 53.2 µg nach 6 Stunden überschritten. Die Wirkstoffmengen in den übrigen gestorbenen Bienen lagen im gleichen Bereich wie die der lebend entnommenen Stichproben.

Anhand der abgefallenen Milben sollten die akarizide Wirkung und die von den Milben aufgenommene Akarizidmenge untersucht werden. Ergebnisse dazu liegen nur aus den Wintervölkern A, B, C und D vor. Bei diesen Völkern konnte der zeitliche Verlauf des Milbenfalls verfolgt werden (Abb. 10, Tab. 9).

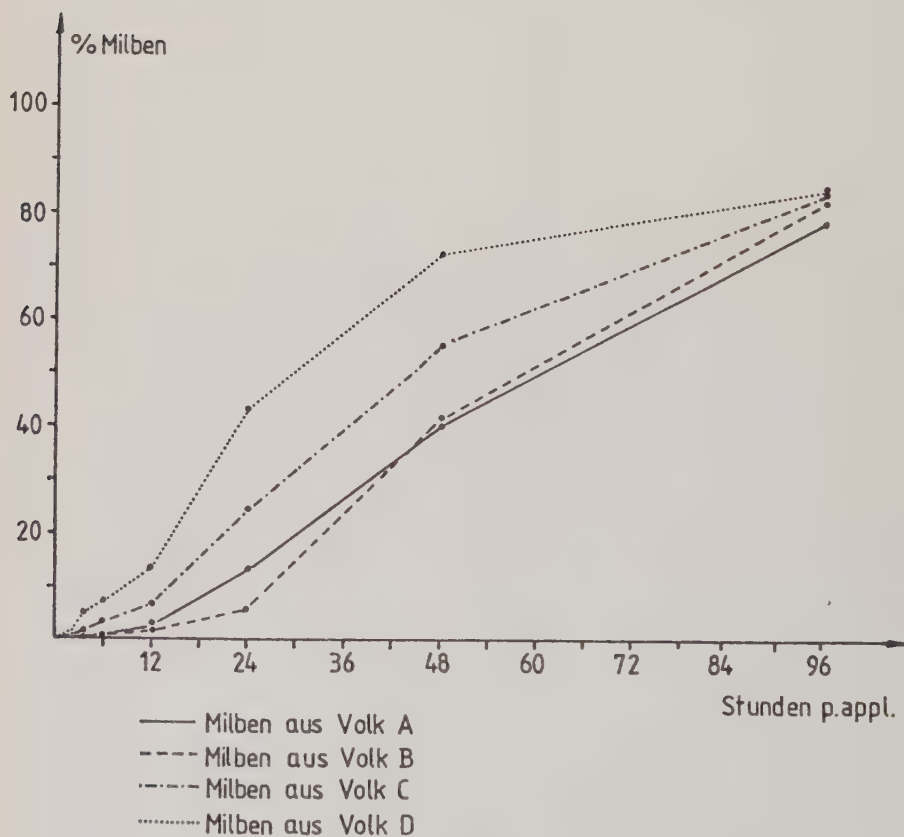


Abb. 10: Zeitlicher Verlauf des Milbenfalls in Wintervölkern

Zeitraum nach der Behandlung (Std.)	V o l k A		V o l k B		V o l k C		V o l k D	
	Milben % Milben (abs.)	Milben (aufsumm.) (pro h)	Milben % Milben (abs.)	Milben (aufsumm.) (pro h)	Milben % Milben (abs.)	Milben (aufsumm.) (pro h)	Milben % Milben (abs.)	Milben (aufsumm.) (pro h)
0 - 1	-	- 0	-	- 0	-	- 0	6	0.6 6.0
1 - 2	-	- 0	-	- 0	8	0.5 4.0	4	1.0 2.0
2 - 4	1	0.1 0.5	1	0.1 0.5	13	1.3 6.5	42	5.2 21.0
4 - 6	4	0.5 2.0	4	0.4 2.0	22	2.7 11.0	23	7.5 12.5
6 - 12	15	2.1 2.5	8	1.0 1.3	62	6.7 10.3	64	14.0 10.6
12 - 24	107	13.2 8.9	63	5.8 5.2	270	24.3 22.5	288	43.1 24.0
24 - 48	265	40.7 11.0	469	41.4 19.5	499	56.7 20.8	289	72.3 12.0
48 - 96	373	79.3 77.8	541	82.4 11.3	420	84.0 8.8	121	84.5 2.5
überlebt	200	20.7	232	17.6	244	16.0	153	15.5
gesamt	965	100 %	1318	100 %	1538	100 %	990	100 %

Tab.9 : Milbenfall nach der Behandlung von Wintervölkern in Abhängigkeit von der Zeit

Bei einmaliger Behandlung wurden in allen Völkern etwa 80% der Milben innerhalb von 4 Tagen abgetötet. Unter konstanten Klimabedingungen im Kühlraum hat die Kurve des Milbenfalls ihre stärkste Steigung zwischen 24 und 48 Stunden. In diesem Zeitraum lag der stärkste Milbenfall mit 11.0 bzw. 15.9 abgefallenen Milben pro Stunde.

Im Freiland fielen mit 22.5 bzw. 24.0 Milben pro Stunde die meisten Milben je Zeiteinheit schon von 12 bis 24 Stunden nach der Behandlung ab. Die Kurve des Milbenfalls verläuft für diese beiden Völker in der letzten Hälfte des Versuchszeitraums wesentlich flacher als für die Völker A und B bei konstantem Klima im Kühlraum.

Zeit p. appl.	Proben- zahl (n)	Milben- zahl (n)	Wirkstoff- menge $\bar{x}$ (ng WS/Milbe)	Standard- abweichung (ng WS/Milbe)
bis 24 h	9	905	13.96	9.62
24-48 h	14	1335	6.35	4.25
48-96 h	14	1433	8.03	4.96
>100 h	8	839	5.97	2.86

Tab. 10: Durchschnittlich von Milben aufgenommene Akarizidmenge in Abhängigkeit von der Zeit bis zum Abfallen

In Sammelproben von Milben, die innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Behandlung abgefallen waren, konnten durchschnittlich 13.96 ng Wirkstoff pro Milbe nachgewiesen werden. Dabei fanden sich in den jeweils ersten Proben - mit Milben, die innerhalb von 1 bis 12 Stunden (Völker A und B) bzw. 2 bis 24 Stunden (Völker C und D) abgefallen waren - 8.23 ng pro Milbe für Volk A, 32.88 ng/Milbe für Volk B, 12.09 ng/Milbe für Volk C und 29.97 ng/Milbe für Volk D; In den übrigen Sammelproben lagen die pro Milbe festgestellten Wirkstoffmengen zwischen 6.02 und 10.69 ng.

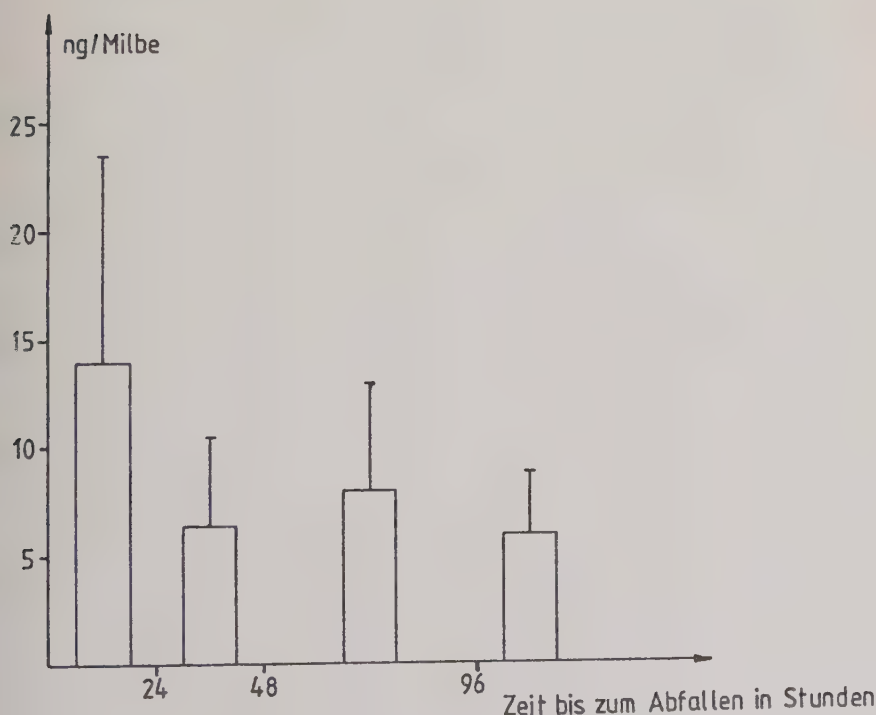


Abb. 11: Wirkstoffaufnahme der Milben in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Abfallens nach der Behandlung der Völker

Später abgefallene oder auf den Bienen verbliebene Milben wiesen deutlich geringere Akarizidmengen auf (Abb. 11, Tab. 10). Die Werte für diese Proben lagen zwischen 5.97 und 8.03 ng pro Milbe und unterschieden sich im U-Test (Siegel, 1976) nicht signifikant voneinander.

Brutstadium (Tiere/Probe)	Durchschnittliche Impulsrate (CPM)					
	Volk A	Volk B	Volk C	Volk D	Volk E	Volk F
Puppe (1/Probe)					9.8 s= 3.0 (n=20)	9.6 s= 2.6 (n=17)
Streckmaden (1/Probe)	29.9 s=15.3 (n=10)	28.6 s=18.4 (n=10)	16.6 s= 7.7 (n=10)	29.8 s=11.1 (n=10)		
Larve V (1/Probe)	34.5 s=19.6 (n= 9)	46.3 s=19.9 (n= 4)	33.8 s=24.4 (n=10)		13.7 s= 3.0 (n=20)	13.2 s= 3.0 (n=19)
Larve IV (5/Probe)	19.3 (n= 1)	26.2 (n= 2)	17.9 (n= 1)		13.5 s= 2.8 (n=20)	22.0 s= 6.8 (n=20)
Larve III (10/Probe)	16.2 (n= 2)				13.5 s= 4.5 (n=17)	15.3 s= 2.3 (n= 5)

Tab. 11: Durchschnittliche Impulsraten (CPM) der Brutproben
(n = Zahl der Proben, s = Standardabweichung)

Um festzustellen, ob das Akarizid auch die Bienenbrut erreicht, wurden Brutproben untersucht. In Tab. 11 sind die Impulsraten (CPM) für die einzelnen Larvenstadien angegeben. Die in den Proben von Bienenbrut gemessene Radioaktivität war sehr gering. Auf Grund der dadurch bedingten Meßungenauigkeit wurde auf eine Umrechnung der CPM-Werte auf Wirkstoffmenge verzichtet.

Das methodisch bedingte Hintergrundrauschen lag bei ca. 20 CPM. Die Werte der meisten Proben lagen darunter, so daß in ihnen keine Radioaktivität nachweisbar war. Lediglich in Streckmaden und Maden des 5. Larvenstadiums aus den Wintervölkern wurden Werte knapp über dem Rauschbereich gemessen.

3.2.2. Ergebnisse der Untersuchungen über die Verteilung von markiertem Futter in Bienengruppen

Bei der Untersuchung der Verteilung von markierten Zuckerlösungen stellte sich heraus, daß die in den einzelnen Bienen wiedergefundenen Anteile der verfütterten Lösung zwischen weniger als 1 Nanoliter und 10 Mikroliter lagen. In den meisten Bienen konnten Mengen unter 1 Mikroliter nachgewiesen werden (Abb. 12 bis 17). Bei Einteilung in gleichgroße Klassen ergaben sich sehr uniforme Häufigkeitsverteilungen für Gruppen mit unterschiedlichen Versuchsbedingungen. Die in Anlehnung an Kloft et al. (1976) vorgenommene Einteilung der logarithmierten Werte in Klassen mit einer Breite von 0.5 läßt dagegen eine Differenzierung der Häufigkeits-Profile von Gruppen mit verschiedenen Bedingungen erkennen.

Um die Farbstoffmarkierung mit der Isotopenmarkierung zu vergleichen, wurden jeweils die Häufigkeiten der 6 gleichen Ansätze aufsummiert. Die relativierten Häufigkeitswerte für Farbstoff- und Isotopenmarkierung nach gleicher Versuchszeit wurden einander gegenübergestellt.

In allen Fällen hatten mehr als 70% der Bienen weniger als 1 μ l Futterlösung aufgenommen. Bei gleichmäßiger Einteilung in Klassen von 1 μ l Breite konnten die Ergebnisse im χ^2 -Test (Siegel, 1976) nicht als signifikant verschieden abgesichert werden.

Der Vergleich der logarithmierten Werte zeigte dagegen sowohl nach 1 als auch nach 6 Stunden deutlichere Unterschiede (Abb. 12a u. 12b). Nach einer Stunde ohne zusätzliches Futterangebot ließen sich mit Isotopenmarkierung 40.7% der Bienen der Klasse von 0.003 bis 0.01 μ l und 20% der von 1 bis 3 μ l zuordnen. Im mittleren Bereich, zwischen 0.03 und 0.3 μ l waren kaum Bienen zu finden (3.0 und 4.7% je Klasse). Mit der Methode der Farbstoffmarkierung wurde in diesem Bereich ein höherer Anteil (17.6 und 11.0%) an Bienen gefunden, und der größte Teil der Versuchstiere (31.2%) hatte zwischen 0.3 und 1.0 μ l der Farblösung aufgenommen (Tab. 12a und Abb. 12a).

Die beiden Methoden ergaben für eine Stunde Verteilungszeit signifikant unterschiedliche Häufigkeitsverteilungen (χ^2 -Test, 0.5% Irrtumswahrscheinlichkeit). Nach 6 Stunden sind sich die Häufigkeitsprofile für beide Markierungsmethoden ähnlicher (Abb. 12b u. Tab. 12b). Allerdings konnte mit Isotopenmarkierung das Häufigkeitsmaximum zwischen 0.01 und 0.03 μ l ermittelt werden, während es bei der Farbmarmarkierung in der Klasse von 0.03 bis 0.1 μ l lag. Auch konnten hier 16.7% der Bienen mit weniger als 3 nl gefunden werden, mit Isotopenmarkierung dagegen ließ sich keine Biene mit solch geringen Mengen der verfütterten Lösung nachweisen. Die Ergebnisse aus beiden Methoden zeigten nach 6 Stunden Versuchsdauer im χ^2 -Test ebenfalls signifikante Unterschiede ($p = 0.005$).

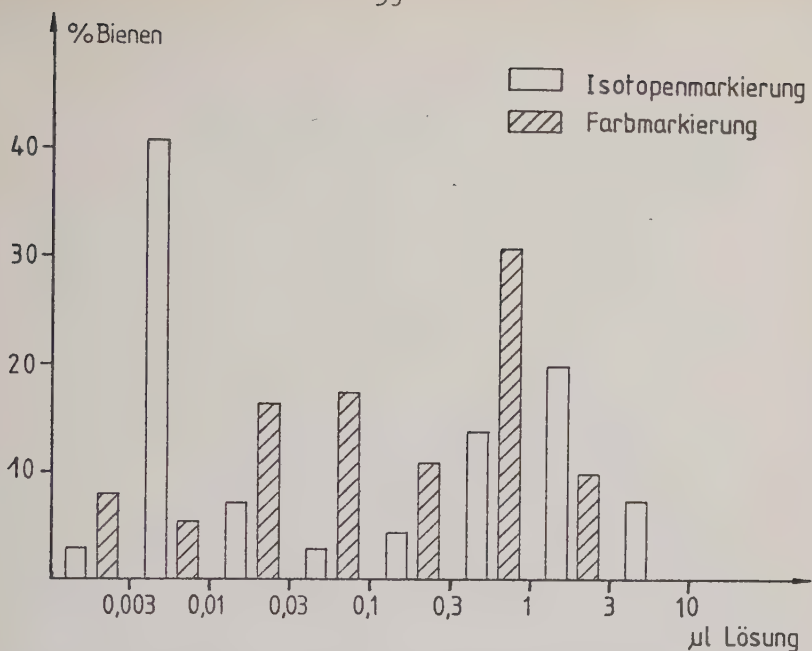


Abb. 12a: Vergleich der Verteilung von Futterlösungen mit Farbstoffmarkierung und Isotopenmarkierung (1 Stunde Versuchsdauer)

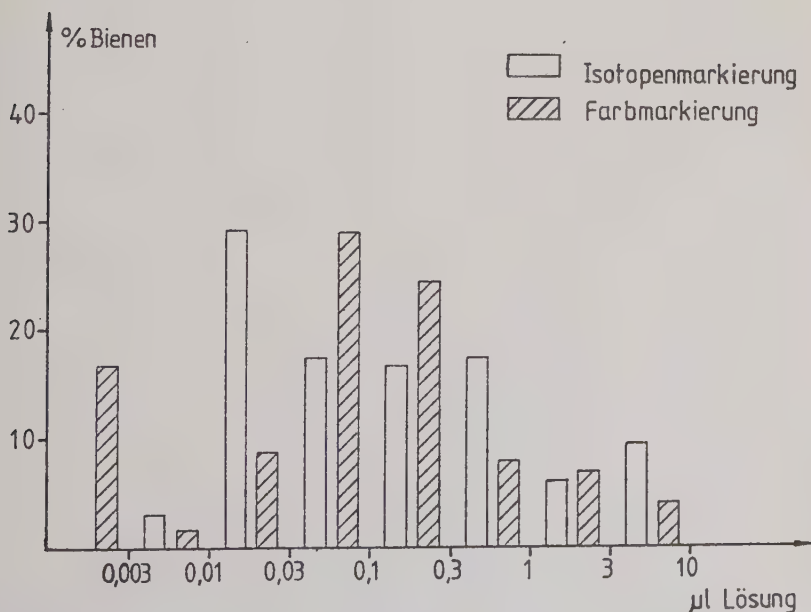


Abb. 12b: Vergleich der Verteilung von Futterlösungen mit Farbstoffmarkierung und Isotopenmarkierung (6 Stunden Versuchsdauer)

Klasse (lg nl Lsg.)	Klasse (µl Lsg.)	Isotop (n)	Isotop (%)	Farbstoff (n)	Farbstoff (%)
0.5	0.003	7	3.0	16	8.0
0.5-1	0.003-0.01	96	40.7	11	5.5
1-1.5	0.01-0.03	17	7.2	33	16.6
1.5-2	0.03-0.1	7	3.0	35	17.6
2-2.5	0.1-0.3	11	4.6	22	11.1
2.5-3	0.3-1	33	13.9	62	31.2
3-3.5	1-3	47	20.0	20	10.0
3.5-4	3-10	<u>18</u>	7.6	<u>0</u>	0
Σ n		236		199	

Tab. 12a: Vergleich der Häufigkeiten bei Verteilung von Futterlösung in Bienengruppen mit Isotopenmarkierungsmethode und Farbstoffmarkierungsmethode.
Verteilungszeit: 1 Stunde

Klasse (lg nl Lsg.)	Klasse (µl Lsg.)	Isotop (n)	Isotop (%)	Farbstoff (n)	Farbstoff (%)
0.5	0.003	0	0	40	16.7
0.5-1	0.003-0.01	8	3.3	4	1.7
1-1.5	0.01-0.03	70	29.2	21	8.8
1.5-2	0.03-0.1	42	17.5	70	29.1
2-2.5	0.1-0.3	40	16.7	59	24.5
2.5-3	0.3-1	42	17.5	19	7.9
3-3.5	1-3	15	6.2	17	7.1
3.5-4	3-10	<u>23</u>	9.6	<u>10</u>	4.2
Σ n		240		240	

Tab. 12b: Vergleich der Häufigkeiten bei Verteilung von Futterlösung in Bienengruppen mit Isotopenmarkierungsmethode und Farbstoffmarkierungsmethode.
Verteilungszeit: 6 Stunden

Um den Einfluß des Platzangebots zu prüfen, wurden 3 Käfigtypen verwendet, in denen den Bienen jeweils 1.9 cm^3 , 5.1 cm^3 und 17.2 cm^3 Raum pro Tier zur Verfügung stand. Die aufsummierten Häufigkeiten aus 6 Parallelansätzen sind für alle drei Versuchsserien nahezu gleich (Tab. 13, Abb. 13). Die geringen Unterschiede erwiesen sich im χ^2 -Test als zufallsbedingt.

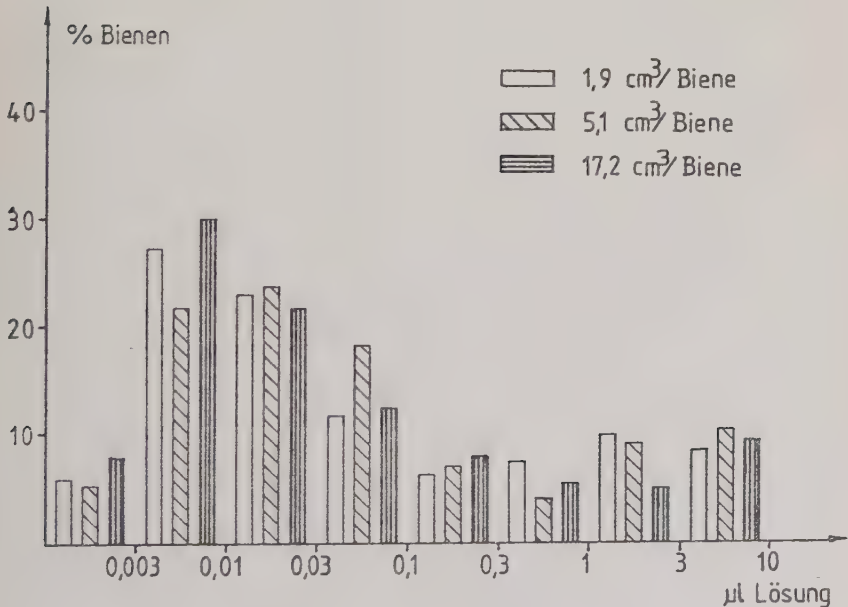


Abb. 13: Einfluß des Platzangebots auf die Futterverteilung

Klasse (lg nl Lsg.)	Klasse (µl Lsg.)	abs. Häufigk. 1.9 cm ³ /Biene	rel. Häufigk. 1.9 cm ³ /Biene	abs. Häufigk. 5.1 cm ³ /Biene	rel. Häufigk. 5.1 cm ³ /Biene	abs. Häufigk. 17.2 cm ³ /Biene	rel. Häufigk. 17.2 cm ³ /Biene
0.5	0.003	14	5.8	13	5.4	19	7.9
0.5-1	0.003-0.01	65	27.2	52	21.7	72	30.0
1 -1.5	0.01-0.03	55	23.1	57	23.7	52	21.7
1.5-2	0.03-0.1	28	11.7	44	18.3	30	12.5
2 -2.5	0.1-0.3	15	6.3	17	7.1	19	7.9
2.5-3	0.3-1	18	7.5	10	4.2	13	5.4
3 -3.5	1-3	24	10.0	22	9.2	12	5.0
3.5-4	3-10	20	8.4	25	10.4	23	9.6
		239	100 %	240	100 %	240	100 %

Tab. 13: Vergleich der Häufigkeiten bei der Futterverteilung in Abhängigkeit vom Platzangebot

Um einen Einfluß der Gruppengröße festzustellen, wurde die Futterverteilung in Versuchsgruppen mit 40 und 80 Bienen untersucht. Die aufsummierten Häufigkeiten von je 6 gleich-großen Gruppen waren ähnlich (Abb. 14, Tab. 14). Lediglich in der Klasse unter 0.003 μl traten mit 31.0% bei 40 und 18.7% bei 80 Bienen deutliche Unterschiede auf. Dagegen lagen in den kleineren Gruppen nur 7.5% der Bienen in der Klasse von 0.03 bis 0.1 μl , gegenüber 18.5% der Bienen aus den größeren Versuchsgruppen.

Im χ^2 -Test erwiesen sich die beiden Häufigkeitsverteilungen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0.5% als signifikant verschieden.

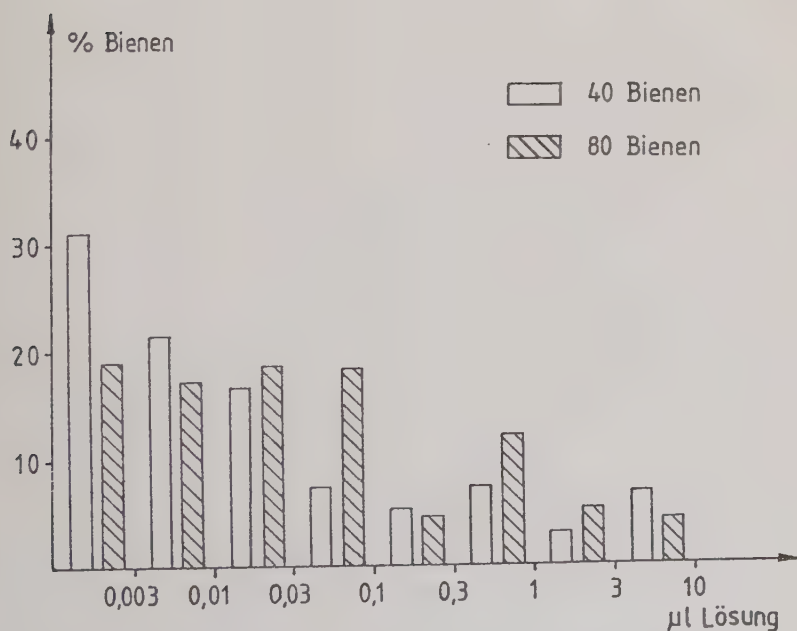


Abb. 14: Einfluß der Gruppengröße auf die Futterverteilung

Klasse (lg nl Lsg.)	Klasse (μ l Lsg.)	40 Bienen (n) (%)		80 Bienen (n) (%)	
0.5	0.003	74	31.1	87	18.7
0.5-1	0.003-0.01	51	21.4	80	17.2
1-1.5	0.01-0.03	40	16.7	87	18.7
1.5-2	0.03-0.1	18	7.5	86	18.5
2-2.5	0.1-0.3	13	5.4	22	4.7
2.5-3	0.3-1	18	7.5	57	12.3
3-3.5	1-3	8	3.3	25	5.4
3.5-4	3-10	<u>17</u>	7.1	<u>21</u>	4.5
Σn		239		465	

Tab. 14: Vergleich der Häufigkeiten bei der Futterverteilung in Abhängigkeit von der Gruppengröße

Zur Bestimmung des Einflusses zusätzlicher Futterquellen wurden Bienengruppen, denen 20-, 50- oder 70%ige Zuckerlösung zur Verfügung stand, mit Kontrollgruppen ohne zusätzliches Futterangebot bezüglich ihrer Futterverteilung verglichen. Die Häufigkeitsverteilung von je 6 Parallelversuchen ist in Abb. 15a u. 15b dargestellt (vgl. auch Tab. 15).

Die Farbstoffverteilung in Gruppen mit 20%igem Futterangebot unterschied sich kaum von der in den Kontrollgruppen (kein signifikanter Unterschied im χ^2 -Test).

Dagegen fand man bei Zufütterung mit 50- bzw. 70%iger Zuckerlösung in der Klasse von 0.003 bis 0.01 μ l mit 27.9 bzw. 32.5% Bienen deutlich mehr Individuen als in der Kon-

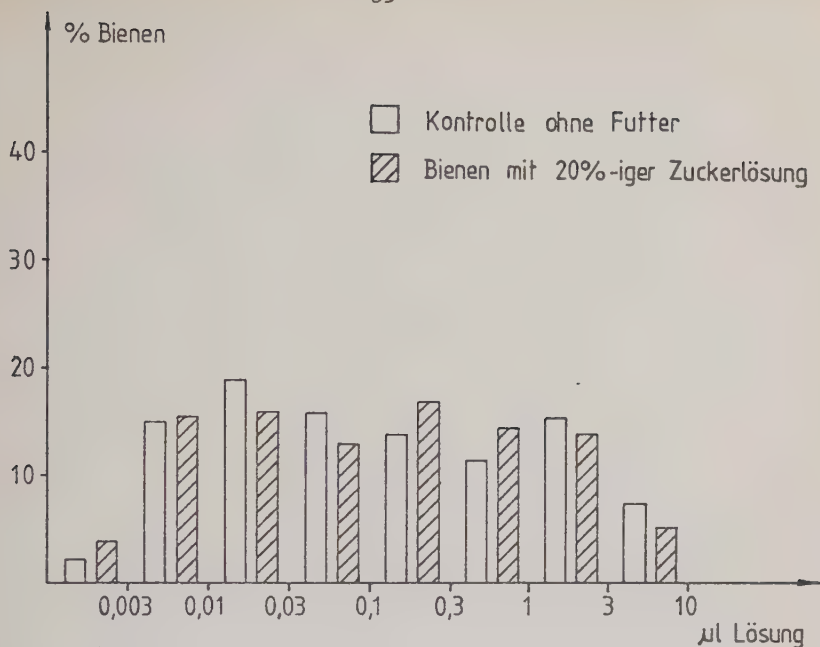


Abb. 15a

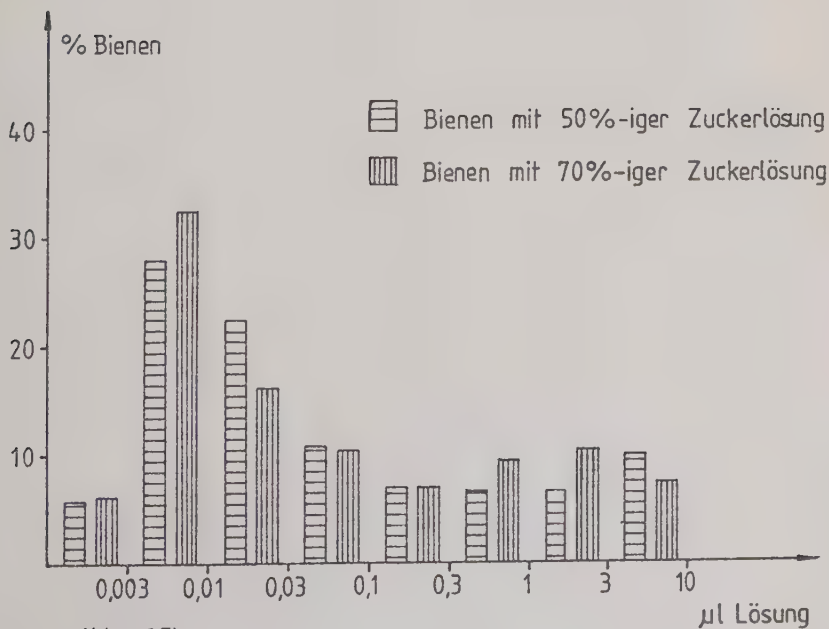


Abb. 15b

Abb. 15a und b: Einfluß der Qualität zusätzlicher Futterquellen auf die Verteilung markierten Futters

Klasse (lg ml Lsg.)	Klasse (µl Lsg.)	Kontrolle (n)	Kontrolle (%)	20%ige Zuckerlösung (n)	20%ige Zuckerlösung (%)	50%ige Zuckerlösung (n)	50%ige Zuckerlösung (%)	70%ige Zuckerlösung (n)	70%ige Zuckerlösung (%)
0.5	0.003	5	2.1	9	3.8	14	5.8	15	6.2
0.5-1	0.003-0.01	36	15.1	37	15.6	67	27.9	78	32.5
1-1.5	0.01-0.03	45	18.8	38	16.0	54	22.5	39	16.3
1.5-2	0.03-0.1	38	15.9	31	13.1	26	10.8	25	10.4
2-2.5	0.1-0.3	33	13.8	40	16.9	17	7.1	17	7.1
2.5-3	0.3-1	27	11.3	34	14.4	22	9.2	23	9.6
3-3.5	1-3	37	15.5	33	13.9	16	6.7	25	10.4
3.5-4	3-10	18	7.5	15	6.3	24	10.0	18	7.5
		<u>239</u>	<u>100 %</u>	<u>237</u>	<u>100 %</u>	<u>240</u>	<u>100 %</u>	<u>240</u>	<u>100 %</u>

Tab. 15: Vergleich der Häufigkeiten bei der Futterverteilung in Abhängigkeit von der Qualität zusätzlicher Fütterung

trollgruppe (15.1% der Bienen). Andererseits wiesen weniger Versuchstiere Werte zwischen 0.1 und 0.3 μl auf (7.1%, in beiden Fällen), als bei der Kontrolle mit 13.8% der Bienen.

Die Gruppen, denen 50- und 70%ige Zuckerlösung angeboten wurde, zeigten eine von Kontrollgruppen und Gruppen mit 20%igem Futterangebot signifikant verschiedene Farbstoffverteilung (χ^2 -Test, $p = 0.005$), während sie sich untereinander im χ^2 -Test nicht signifikant unterschieden.

Um die Auswirkung des Fütterungszustandes vor Versuchsbeginn auf die Futterverteilung zu untersuchen, wurde von Gruppen mit gleichen Versuchsbedingungen das durchschnittliche Honigmagengewicht und der Medianwert der wiedergefundenen Farblösungsmengen in Beziehung zueinander gesetzt.

Es konnten 2 Datensätze mit je 12 Versuchsgruppen und 3 Sätze von jeweils 6 Gruppen zusammengestellt werden (Tab. 16a bis 16e).

Die Regressionsanalyse nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate ergab Korrelationskoeffizienten von 0.01 bis 0.76. In drei Fällen wurden abfallende Regressionsgeraden (Steigungsfaktor < 0) gefunden, zweimal wies die Gerade eine positive Steigung auf.

Tabellen 16a-e: Abhängigkeit des Ausmaßes der Futterverteilung vom Fütterungszustand. Gegenüberstellung des durchschnittlichen Honigmagen-Gewichts (HMG) in mg und des Medians der Farblösungsmenge in lg nl Lösung.

Ø HMG (mg)	1.0	1.7	2.3	2.8	3.5	3.6	4.5	5.4	6.0
Median (lg nl)	1.37	2.60	1.55	1.92	1.70	2.02	1.80	1.16	0.80
	1.82		1.92				2.29		

Tab. 16a: Korrelationskoeffizient: -0.423
Versuchsbedingungen: 40 Bienen, Verteilungszeit 1 Stunde, kein Futterangebot, Platzangebot 5.1 cm³/Biene.

Ø HMG (mg)	1.0	2.5	3.5	4.5	6.0	11.5	22.6
Median (lg nl)	1.60	1.04	0.99	1.70	1.49	1.23	1.35
	0.92	0.90		1.15		1.06	0.87

Tab. 16b: Korrelationskoeffizient: -0.106
Versuchsbedingungen: 40 Bienen, Verteilungszeit 1 Stunde, kein Futterangebot, Platzangebot 1.9 cm³/Biene.

Ø HMG (mg)	1.7	2.3	2.3	2.8	3.6	5.4
Median (lg nl)	1.18	1.02	2.32	2.63	2.11	2.14

Tab. 16c: Korrelationskoeffizient: 0.421
Versuchsbedingungen: 40 Bienen, Verteilungszeit 1 Stunde, Futterangebot 20%, Platzangebot 5.1 cm³/Biene.

Ø HMG (mg)	1.7	2.3	2.3	2.8	3.6	5.4
Median (lg nl)	1.01	1.03	2.18	1.36	2.40	1.08

Tab. 16d: Korrelationskoeffizient: 0.012
Versuchsbedingungen: 40 Bienen, Verteilungszeit $\frac{3}{1}$ Stunde, Futterangebot 50%, Platzangebot 5.1 cm³/ Biene.

Ø HMG (mg)	1.7	2.3	2.3	2.8	3.6	5.4
Median (lg nl)	1.90	1.16	1.48	1.20	1.60	0.65

Tab. 16e: Korrelationskoeffizient: -0.758
Versuchsbedingungen: 40 Bienen, Verteilungszeit $\frac{3}{1}$ Stunde, Futterangebot 70%, Platzangebot 5.1 cm³/ Biene.

3.2.3. Ergebnisse der Untersuchungen über die Verteilung des Akarizids im Bienenkörper

Zur Überprüfung eines eventuellen Verlustes von Wirkstoff durch Verstoffwechselung, Ausscheidung oder methodische Fehler wurden Bienen als Ganzes aufgearbeitet und gemessen. Bei diesen Proben konnte keine zeitabhängige Veränderung der wiedergefundenen Akarizidmenge festgestellt werden (Tab. 17). Die Werte streuen von 96.6 bis 104.6% der verabreichten Menge von 9.9 µg Akarizid pro Biene.

Zeit	30min	1Std.	2Std.	4Std.	6Std.	12Std.	24Std.
Zahl der Proben (n)	3	3	4	3	2	6	3
Mittelwert (µg WS)	9.719	9.566	10.276	10.277	10.355	9.864	9.696
%	98.2	96.6	103.8	103.3	104.6	99.6	97.9

Tab. 17: Menge des wiedergefundenen Wirkstoffs in ganzen Bienen in Abhängigkeit von der Zeit

Die zeitliche Veränderung der Akarizidmenge im Honigmagen der Bienen wurde über 24 Stunden untersucht. Es konnte schon nach 30 Minuten nur noch 1.75 µg der verfütterten 9.9 µg nachgewiesen werden. Die Medikamentenmenge in der Honigblase nahm bis 4 Stunden nach der Aufnahme rasch ab und näherte sich innerhalb von 24 Stunden asymptotisch Null (Abb. 16, Tab. 18).

Der Unterschied zwischen den Werten nach 30 Minuten und 1 Stunde läßt sich im Mediantest nicht als signifikant absichern.

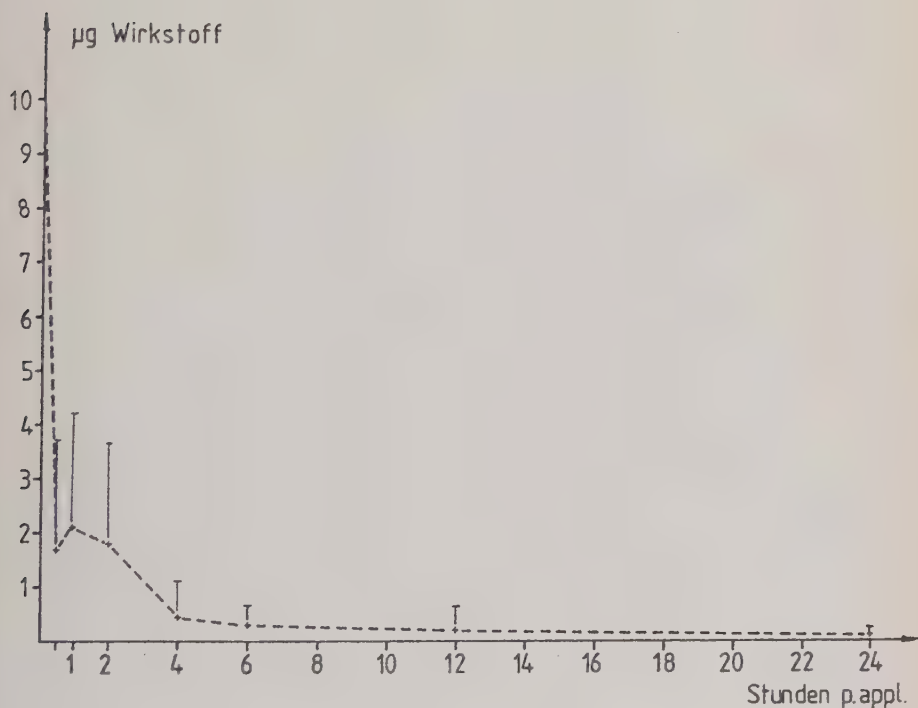


Abb. 16: Wirkstoffmenge im Honigmagen in Abhängigkeit von der Zeit nach der Applikation

Zeit	30min	1Std.	2Std.	4Std.	6Std.	12Std.	24Std.
Zahl der Proben (n)	27	30	20	25	13	33	22
Mittelwert (µg WS)	1.678	2.135	1.809	0.444	0.306	0.228	0.062
Standardabweichung	2.049	2.046	1.851	0.644	0.341	0.430	0.104

Tab. 18: Zeitabhängige Veränderung der Wirkstoffmenge im Honigmagen

Zeit	30min	1Std.	2Std.	4Std.	6Std.	12Std.	24Std.
Zahl der Proben (n)	25	29	18	21	15	31	19
Mittelwert (µg WS)	3.613	4.090	5.124	8.201	8.580	8.637	8.408
Standardabweichung	1.359	1.428	1.935	1.794	1.381	1.214	1.151

Tab. 19: Zeitabhängige Veränderung der Wirkstoffmenge in Darm und Kotblase

Die in Mittel-, Dünn- und Enddarm nachgewiesene Wirkstoffmenge stieg von durchschnittlich 3.61 μg nach 30 Minuten auf 8.59 μg nach 6 Stunden an und blieb dann auf einem konstanten Niveau (Abb. 17, Tab. 19).

Die Anreicherung des Medikaments im Darm erfolgte also in den ersten 4 Stunden nach der oralen Verabreichung. Danach auftretende geringe Unterschiede erwiesen sich im Mediantest als zufallsbedingt.

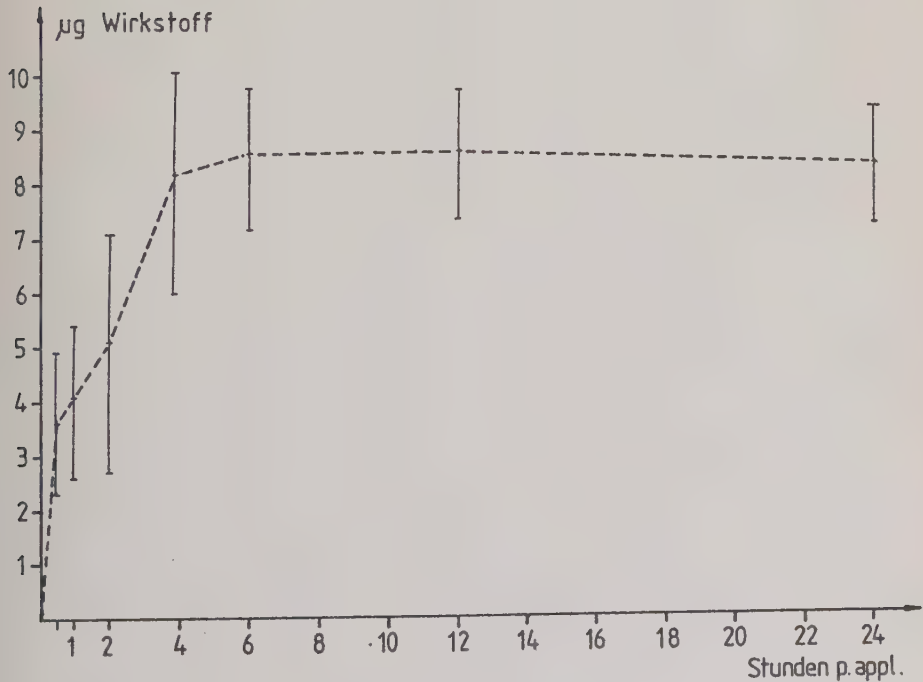


Abb. 17: Wirkstoffmenge im Darmtrakt in Abhängigkeit von der Zeit nach der Applikation

Da das Blut der Bienen den Milben als Nahrung dient, wurde die Akarizid-Konzentration in der Hämolymphe gemessen.

Schon nach 30 Minuten konnten Wirkstoffkonzentrationen von 24.9 ng/μl nachgewiesen werden (Abb. 18, Tab. 20). Nach einer Stunde wurde das Maximum von durchschnittlich 30.1 ng/μl erreicht. Danach sank die Konzentration wieder ab und war nach 4 Stunden mit 17.5 ng/μl signifikant niedriger (Median-test, $p = 0.025$).

Bis 12 Stunden nach der Applikation fiel der Hämolymphe-spiegel weiter auf 5.0 ng/μl ab. Die Durchschnittswerte nach 12 und 24 Stunden erwiesen sich im Mediantest nicht als signifikant verschieden.

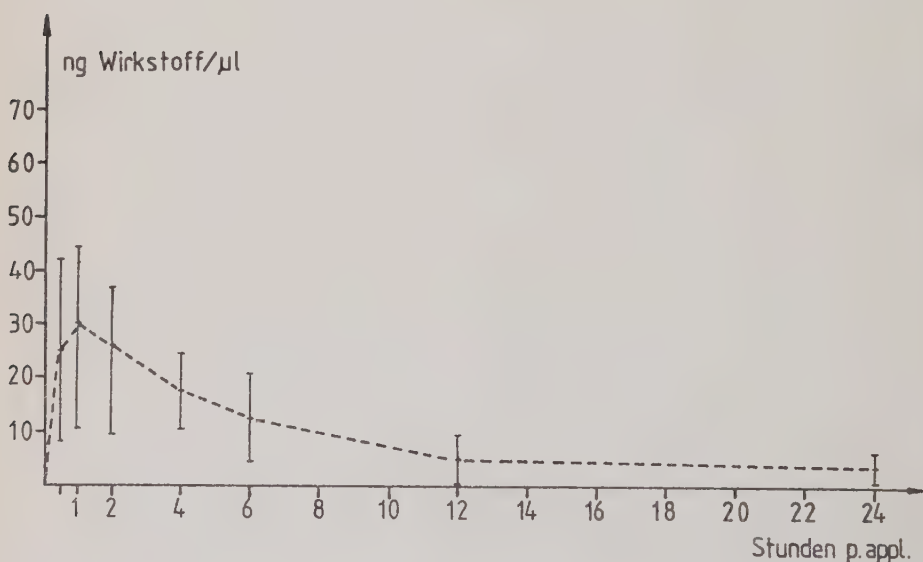


Abb. 18: Wirkstoffkonzentration in der Hämolymphe in Abhängigkeit von der Zeit nach der Applikation

Crailsheim (1985) gibt für Stockbienen im Sommer eine Hämolympfmenge von 19.0 μl ($\pm 1.1 \mu\text{l}$) an. Daraus läßt sich ableiten, daß insgesamt bis zu 0.57 μl des Akarizids in der Hämolymphe zirkulierten.

Neben der Hämolymphe wurden noch weitere Organe untersucht. Die Wirkstoffmenge in der Giftblase stieg innerhalb der ersten Stunde nach der Applikation stark an (Abb. 19, Tab. 21). Der höchste Durchschnittswert lag bei 39.1 ng nach einer Stunde. Danach nahmen die Werte bis 12 Stunden nach der Applikation deutlich ab. Die Mengen an Medikament in der Giftblase nach 12 und 24 Stunden unterscheiden sich nicht mehr signifikant (Mediantest, Siegel, 1976).

Ein Vergleich zwischen den kompletten Stachelapparaten und den abpräparierten Giftblasen zeigt, daß in Stachelapparaten von Bienen, die 4, 6 und 12 Stunden nach Fütterung des Medikaments getötet wurden, durchschnittlich 6.83 ng Wirkstoff mehr gefunden wurden (Abb. 19, Tab. 22).

Zeit	30min	1Std.	2Std.	4Std.	6Std.	12Std.	24Std.
Zahl der Proben (n)	21	26	19	24	23	49	21
Mittelwert (ng WS/ μl)	24.9	30.1	25.8	17.5	12.5	5.0	3.8
Standardabweichung	16.8	19.5	11.1	6.8	8.2	4.8	2.9
Gesamtmenge (μg WS)	0.47	0.57	0.49	0.33	0.24	0.10	0.07

Tab. 20: Zeitabhängige Veränderung der Wirkstoffkonzentration in der Hämolymphe

Die Werte für das Gesamtorgan liegen jedoch innerhalb der Standardabweichung der Wirkstoffmengen für isolierte Giftblasen. Zu der sehr hohen Akarizidmenge im Stachelapparat nach 2 Stunden (97.1 ng) liegt kein Vergleichswert von isolierten Giftblasen vor.

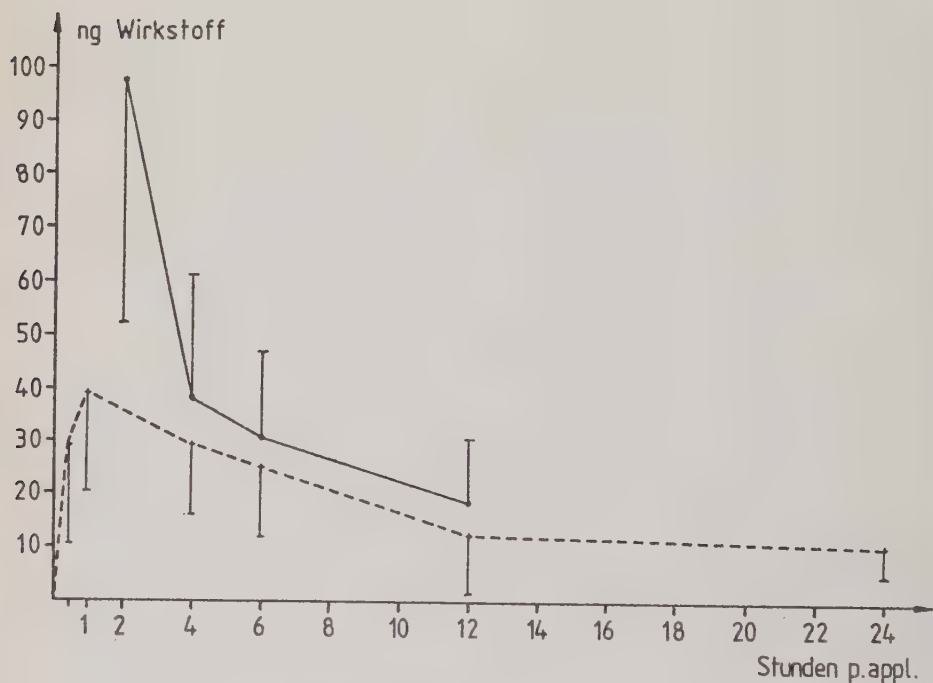


Abb. 19: Wirkstoffmenge in Giftblase und Stachelapparat in Abhängigkeit von der Zeit nach der Applikation (—•— = Stachelapparat; —+— = Giftblase)

Zeit	30min	1Std.	2Std.	4Std.	6Std.	12Std.	24Std.
Zahl der Proben (n)	25	27	0	23	9	27	21
Mittelwert (ng WS)	28.9	39.1		29.3	25.0	12.4	10.4
Standardabweichung	18.2	18.5		13.3	13.2	10.7	5.4

Tab. 21: Zeitabhängige Veränderung der Wirkstoffmenge in der Giftblase

Zeit	2Std.	4Std.	6Std.	12Std.
Anzahl der Proben	20	4	9	24
Mittelwert (ng WS)	97.1	38.0	30.8	18.4
Standardabweichung	45.4	22.9	16.1	12.2

Tab. 22: Zeitabhängige Veränderung der Wirkstoffmenge im Stachelapparat

In der Flugmuskulatur der Biene konnte schon nach 30 Minuten eine durchschnittliche Akarizid-Konzentration von 116 ng pro mg nachgewiesen werden (Abb. 20, Tab. 23). Auch nach 2 Stunden waren noch 109 ng in 1 mg Muskel enthalten. Ab 6 Stunden nach der Medikamentenaufnahme wurden jedoch nur noch geringe Konzentrationen unter 20 ng/mg, nach 24 Stunden sogar unter 2.0 ng/mg, gefunden.

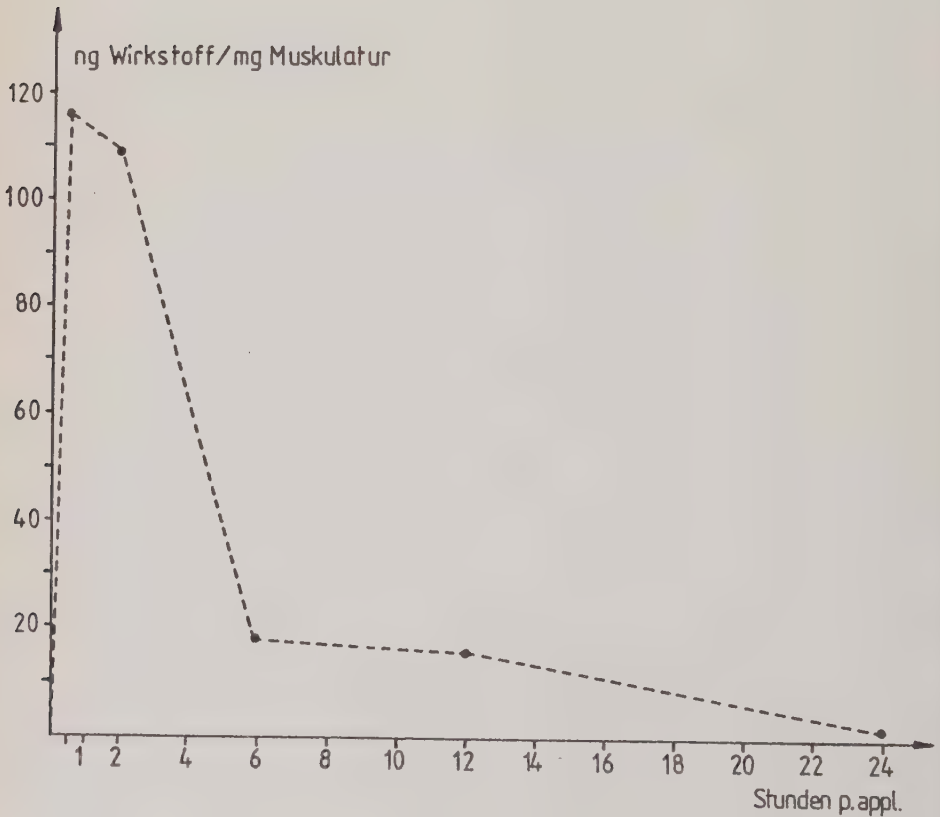


Abb. 20: Wirkstoffkonzentration in Flugmuskulatur in Abhängigkeit von der Zeit nach der Applikation

Im Mediantest erwiesen sich die Werte nach 0.5 und 2 Stunden signifikant höher als die nach 6 und 12 Stunden ($p = 0.005$). Nach 24 Stunden lagen sie noch einmal signifikant niedriger ($p = 0.005$).

Zur Übersicht ist in Abb. 21 die Akarizidmenge im Honigmagen, Darmtrakt sowie der Hämolymphe gegenübergestellt. Die Gesamtmenge an Wirkstoff in der Hämolymphe betrug zu ihrem Maximum nach 1 Stunde 5.8% der applizierten Dosis.

In den ersten 2 Stunden nach der Applikation war ein Defizit von bis zu 4.1 μg Wirkstoff festzustellen, das sich mit zunehmender Versuchsdauer verringerte. Das Auftreten dieses Defizits fiel zeitlich mit hohem Akarizidgehalt in Muskulatur und Stachelapparat zusammen.

Zeit	30 min	2 Std.	6 Std.	12 Std.	24 Std.
Zahl der Proben	5	5	7	6	9
Mittelwert (ng WS/mg)	116	109	18.8	15.8	1.9
Standardabweichung	28.0	73.0	12.2	11.2	1.8

Tab. 23: Wirkstoffkonzentration in der Flugmuskulatur

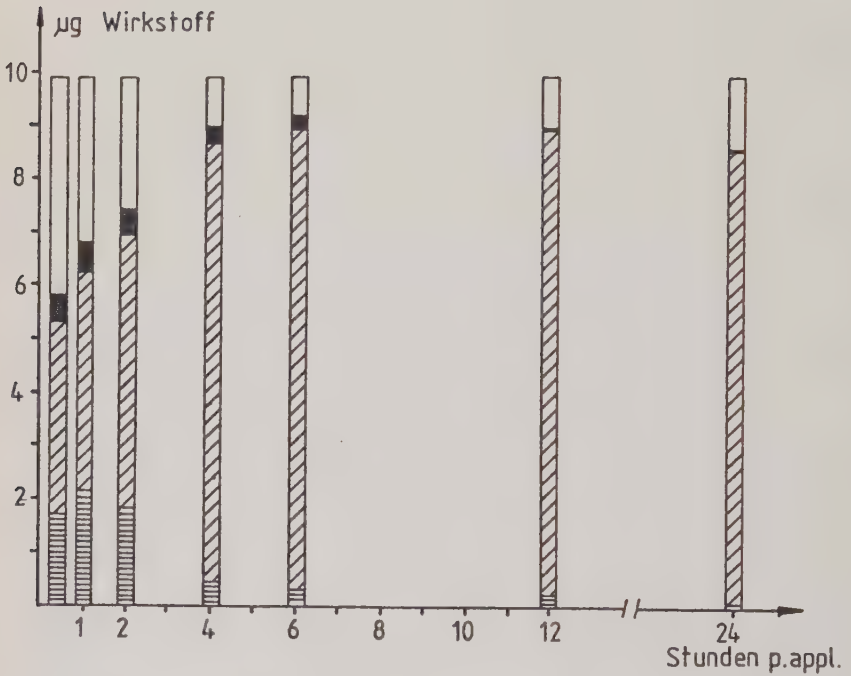


Abb. 21: Wirkstoffmenge in Hämolymphe und Verdauungstrakt im Vergleich zur applizierten Dosis (■ = Hämolymphe; ▨ = Darm und Kotblase; ▩ = Honigmagen)

Die in Milben gemessene Radioaktivität war mit einer Ausnahme nach 30 Minuten (133 CPM, entsprechend 15 ng Wirkstoff) sehr gering. Da die Werte deswegen mit einem großen Fehler behaftet sind, wurde auf eine Umrechnung auf die Wirksubstanz verzichtet. Der Bereich liegt in einer Größenordnung von 1.5 bis 10 ng. Es wurde bis 6 Stunden nach der Fütterung zunehmende Radioaktivität gemessen, die bis 12 Stunden nicht weiter stieg (Abb. 22, Tab. 24).

Bis 6 Stunden konnten nur festsitzende Milben gefunden werden; nach 12 Stunden waren 7 von 13 Milben abgefallen. Die Aktivitäten in festsitzenden und abgefallenen Milben zeigten mit durchschnittlich 69.2 CPM bei festsitzenden und 65.7 CPM bei abgefallenen Milben etwa gleiches Niveau.

Festsitzende Milben						Abgefallene Milben
30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	12 h	12 h
12.1	28.3	33.4	40.3	85.3	84.7	54.4
22.9	34.5	12.4	36.2	111.2	87.6	85.8
22.4	24.6	42.8	57.8	49.4	78.0	92.4
15.4	29.3	28.2		43.3	82.2	88.4
15.5		47.1			49.8	25.0
15.6		33.8			74.0	48.2
(133.0)		25.1			27.8	
$\bar{x}$ 17.3	29.1	31.8	44.8	72.3	69.2	65.7

Tab. 24: Radioaktivität (CPM) in Milben von einzeln gehaltenen Bienen

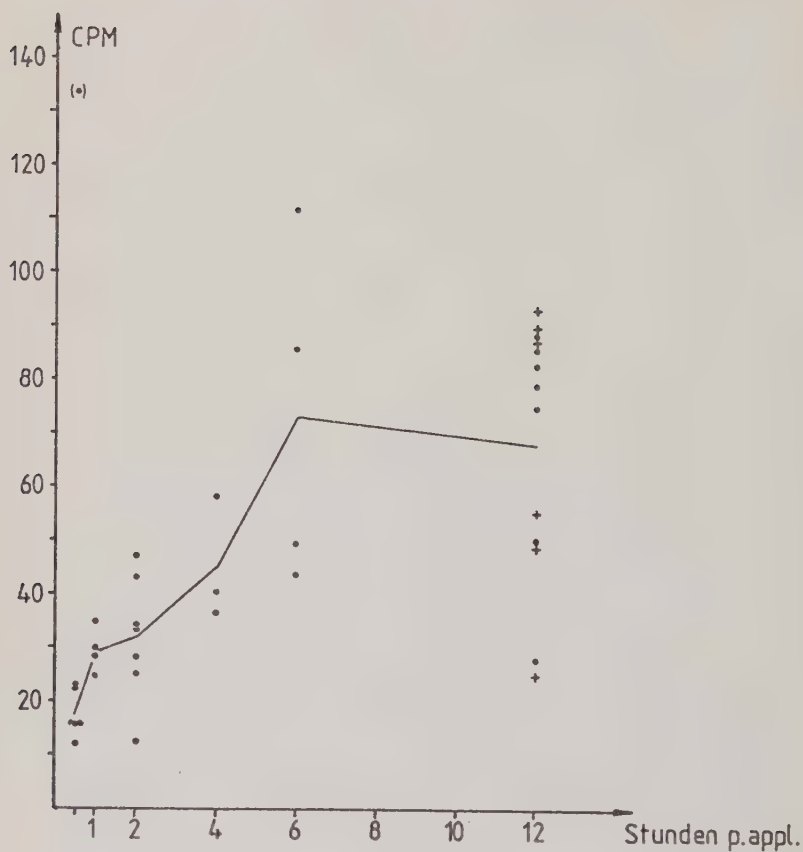


Abb. 22: Radioaktivität in Milben in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation des markierten Akarizids an die Bienen (• = festsetzende Milben; + = abgefallene Milben)

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Ergebnisse über die Verteilung des Akarizids in Bienenvölkern

Bei der Überprüfung der Volkstärke anhand des Bienen gewichts erwies sich die Schätzung der Volkstärke nach besetzten Wabengassen als äußerst ungenau. Die Zahl der besetzten Wabengassen hängt u. a. von der Temperatur und dem Anteil der Bienen außerhalb der Beute ab. Die Dosierung des Wirkstoffs in den einzelnen Völkern war daher sehr unterschiedlich.

In Bienen aus Volk E, das eine Überdosis von 34% erhielt, wurden die höchsten Wirkstoffmengen festgestellt. Setzt man diese Mengen ins Verhältnis zu der errechneten durchschnittlichen Dosis pro Biene, so ergeben sich ähnliche Relativwerte, wie in den Völkern A bis D.

Die Verteilung des Akarizids mit dem Futterstrom im Bienen volk war ein zeitabhängiger Prozeß. Dabei fand ein kontinuierlicher Übergang von der Poisson-Verteilung, bei der viele Bienen wenig Wirkstoff, wenige Bienen große Wirkstoffmengen aufgenommen hatten, zur schiefen Verteilung mit der Tendenz zur Normalverteilung statt. In diesem Stadium hatten die meisten Bienen eine mittlere Dosis erhalten; wenige hatten geringe oder sehr hohe Wirkstoffmengen bekommen. Der Gipfel dieser Verteilungskurve - entsprechend dem Median der Stichprobe - erreicht auch im fortgeschrittensten Stadium der Verteilung nicht die errechnete Durchschnittsdosis pro Biene.

Moritz (1982), der die Verteilung einer radioaktiv markierten Zuckerlösung im Bienen volk untersuchte, fand in Abhängigkeit von der Aufwandsmenge ebenfalls Übergänge von der Poisson-Verteilung zur Normalverteilung.

Mit den 3 Versuchsgruppen (Wintervölker bei konstantem Klima im Kühlraum, Wintervölker und Sommervölker im Freiland) sollten klimatische und jahreszeitliche Einflüsse auf die Verteilung des Akarizids untersucht werden.

Wie sich herausstellte, bestanden kaum grundsätzliche qualitative Unterschiede in der Verteilung. Lediglich in Volk E fand von 48 bis 96 Stunden eine Verminderung des Verteilungsgrades statt. Dies wird trotz der geringen Signifikanz aus Abb. 7, wo nach 96 Stunden mehr Bienen mit kleineren Wirkstoffmengen auftraten als nach 48 Stunden, und Abb. 9, die den Abfall des Medianwertes zeigt, deutlich.

Die Radioaktivität wurde jeweils in ganzen Bienen, einschließlich der Kotblase, bestimmt. Da die Bienen im Sommer ausfliegen und ihre Kotblase entleeren können, läßt sich die Abnahme der Wirkstoffmenge mit der Ausscheidung des Akarizids erklären. In stark abgeschwächtem Ausmaß ist das gleiche auch in Volk F zu beobachten (Abb. 9).

Im Winter wird das Akarizid oder seine Ausscheidungsprodukte mit den übrigen Stoffwechselschlacken in der Kotblase jeder einzelnen Biene gespeichert und nimmt daher nicht ab.

Die Geschwindigkeit der Verteilung von CGA-50439 wies bei den Wintervölkern anfangs geringe Unterschiede auf. Die zunächst etwas raschere Verteilung in den Völkern im Freien (C und D) war jedoch nach 12 Stunden wieder ausgeglichen und unterschied sich nicht mehr von der in den Völkern im Kühlraum (A und B). In beiden Versuchsgruppen veränderte sich die Verteilung in den ersten 12 Stunden deutlich, in den folgenden 84 Stunden dagegen nur noch geringfügig. Dabei nahm der Anteil an Bienen mit größeren Wirkstoffmengen geringfügig zu.

Im Sommer ergaben die beiden Völker unter gleichen Versuchsbedingungen deutlich unterschiedliche Ergebnisse.

In Volk F lag bis 24 Stunden eine Poisson-Verteilung vor und es wurde innerhalb von 96 Stunden keine Normalverteilung erreicht. Die Medianwerte der Stichproben aus diesem Volk lagen weit unter denen aus den übrigen Versuchsvölkern und

erreichten maximal 30.9% der durchschnittlichen Dosis pro Biene. Das bedeutet, daß CGA-50439 nur von sehr wenigen Bienen in ausreichender Dosis aufgenommen wurde.

Über die Gründe für diese geringe Verteilung unter den Bienen können nur Vermutungen angestellt werden. Es besteht die Möglichkeit, daß die aufgeträufelte Behandlungslösung aufgrund eines mangelnden Putztriebes nicht genügend aufgenommen wurde, oder daß sie von den Bienen in die Futtervorräte eingelagert wurde.

Dagegen wurde in Volk E schon nach 12 Stunden eine Normalverteilung erreicht.

Moritz (1982) stellte bei Sommervölkern auf 6 Waben, denen er 50 g radioaktiver Zuckerlösung appliziert hatte, nach 24 Stunden eine Poisson-Verteilung fest. Die Völker E und F, die etwas schwächer waren, erhielten mit 25 bzw. 20 ml Behandlungslösung eine ähnliche Dosis.

Der Verteilungsverlauf in Volk F bestätigt seine Ergebnisse und auch seine Aussage, daß sich Medikamente im Wintervolk besser verteilen, als in Sommervölkern. Die weitaus raschere und gleichmäßigere Verteilung des Akarizids im Volk E widerspricht den Ergebnissen von Moritz jedoch. Dieses Volk zeigt, daß im Sommer bei schnellerem Verteilungsverlauf eine sogar etwas gleichmäßigere Verteilung erreicht wird, als im Winter.

Um zu entscheiden, welcher der beiden Fälle die Regel oder die Ausnahme darstellt, müßten weitere Untersuchungen vorgenommen werden.

Eine Sommerbehandlung hat jedoch nur für Ableger oder Kunstschwärme eine Bedeutung, da Wirtschaftsvölker, die der Gewinnung von Honig dienen, nur im Herbst und Winter behandelt werden dürfen (Ritter und Perschil, 1982).

Um die Bientoxizität von CGA-50439 unter Praxisbedingungen zu überprüfen, wurden Bienen aus dem Totenfall der Sommervölker untersucht. Es fanden sich nur vereinzelt Bienen, die im Vergleich mit den entnommenen Stichproben

überdurchschnittliche Akariziddosen aufgenommen hatten. Daher muß angenommen werden, daß der größte Teil der während der Versuchszeit gestorbenen Bienen durch die Manipulationen bei der Probenahme getötet wurde. Auch in Feldversuchen konnte Ritter (1985) keine erhöhte Bienensterblichkeit nach Behandlung mit CGA-50439 feststellen.

Die Milbenmortalität nach der Behandlung im Winter war über den gesamten Versuchszeitraum von 4 Tagen mit ca. 80% in allen 4 untersuchten Völkern etwa gleich. Im Kühlraum starben die Milben jedoch mit einer Verzögerung gegenüber dem Freiland ab. Da die Verteilung des Akarizids unter den Bienen für diese beiden Versuchsgruppen nicht wesentlich unterschiedlich war, muß eine stärkere Empfindlichkeit der Milben unter den Bedingungen im Freiland angenommen werden. Ein Temperatursturz um 13°C zwischen 12 und 18 Stunden nach der Behandlung kann als zusätzliche Belastung auf die Milben gewirkt haben.

Milben, die in den ersten 24 Stunden nach der Behandlung abgefallen waren, hatten eine höhere durchschnittliche Dosis an CGA-50439 aufgenommen, als länger überlebende Milben. Bei Milben, die später als nach 24 Stunden abfielen, ist jedoch kein Zusammenhang zwischen der Lebensdauer nach der Behandlung und der aufgenommenen Akariziddosis festzustellen. Die höhere Durchschnittsdosis wird insbesondere durch die als erstes eingesammelten Milbenproben, die auch nach 4 bis 6 Stunden abgestorbene Milben enthielten, verursacht.

Dieses Ergebnis läßt zwei Interpretationen zu: Zum einen könnte man eine Abhängigkeit zwischen der Akariziddosis und der Zeit bis zum Abfallen der Milben nach oraler Aufnahme von CGA-50439 vermuten, die nach längerer Zeit jedoch nicht mehr deutlich ist und mit der angewandten Methode nicht eindeutig zu erfassen war.

Andererseits besteht die Möglichkeit, daß beim Aufträufeln der Behandlungslösung ein Teil der Milben von hohen Akarizid-

konzentrationen topikal getroffen wurde. Wenn diese Milben als erstes abstarben, können hierdurch die Durchschnittswerte der ersten Milbenproben erhöht worden sein. Berücksichtigt man diese Proben bei der Berechnung nicht, so ergibt sich für Milben, die zwischen 12 und 24 Stunden abfielen, eine mittlere Dosis von 8.04 ng. Daraus ließe sich ableiten, daß die letale Dosis für Varroa-Milben bei ca. 6 bis 8 ng CGA-50439 liegt.

Zur Beantwortung der Frage, ob CGA-50439 über das Larvenfutter in Bienenbrut gelangt und die Milben auch während ihrer Reproduktionsphase in den Brutzellen erreicht, wurden Brutstadien der Bienen in die Untersuchung einbezogen. In der Bienenbrut wurden sowohl im Sommer, als auch im Winter nur Spuren des Wirkstoffs gefunden. Eine systemische Wirkung von CGA-50439 in der verabreichten Dosis auf die sich in der Brutzelle vermehrenden Milben kann daher nach den vorliegenden Ergebnissen ausgeschlossen werden. Die Anwendung dieses Akarizids ist daher in brutfreien Völkern am sinnvollsten, da sich sonst die Milben in den verdeckelten Brutzellen der Behandlung entziehen (Ritter, 1981).

4.2. Diskussion der Ergebnisse über die Verteilung von Futter in Bienengruppen

Die Versuche mit kleinen Bienengruppen in denen Methylenblau als Tracer eingesetzt wurde, wurden in gleicher Weise durchgeführt wie die Prüfung von Akariziden auf Bienenverträglichkeit und varroizide Wirkung (Ritter, 1985).

Durch den Vergleich der Verteilungen von Farbstoff und radioaktiv markiertem Wirkstoff sollte die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das Akarizid geprüft werden. Das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Verteilung beider Tracer liegen in der gleichen Größenordnung, da bei linearer Klasseneinteilung keine signifikanten Unterschiede auftraten. Überträgt man die Werte in einen logarithmischen Maßstab, so zeigen sich signifikante Unterschiede. Es ist zu vermuten, daß spezifische Eigenschaften, wie Geschmack oder Resorbierbarkeit, zu den Unterschieden bei der Verteilung von Farbstoff und Akarizid geführt haben.

Zur Beurteilung des Einflusses verschiedener Faktoren auf den Futteraustausch wurden die Häufigkeitsverteilungen von Gruppen mit unterschiedlichen Versuchsbedingungen verglichen.

Die Häufigkeitsdiagramme lassen sich so interpretieren, daß der Prozeß des Futteraustausches umso fortgeschrittener ist, je mehr Bienen in der Nähe des errechneten Mittelwertes von 1 μ l pro Biene zu finden sind. Eine Häufung der Werte um 1 μ l ist jedoch kaum zu erwarten, da Pershad (1967) zeigte, daß die Verteilung von Futter in Bienengruppen ein zeitabhängiger Prozeß ist. Zu Beginn von Pershads Untersuchungen hatte der größte Teil der Bienen noch nicht am Futteraustausch teilgenommen, der Rest zeigte sehr unterschiedliche Anteile der verabreichten Radioaktivität. Nach 36 Stunden gab es jedoch nur noch geringe Streuungen um den errechneten Mittelwert.

Aufgrund der unterschiedlichen Darstellungsweisen sind ihre Ergebnisse mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht vergleichbar. Die Einteilung der Daten aus der vorliegenden Untersuchung in die von Pershad gewählten Klassen erbrachte jedoch für eine einstündige Versuchsdauer ähnliche Ergebnisse. Aus methodischen Gründen konnte jedoch keine klare Grenze zwischen Nullwerten und sehr niedrigen Meßwerten gezogen werden.

Die Versuchsdauer von 1 Stunde ergab noch deutliche Unterschiede der Häufigkeitsdiagramme von Bienengruppen mit unterschiedlichen Versuchsbedingungen. Nach 6 Stunden treten diese Unterschiede nicht mehr so klar in Erscheinung, was aus Abb. 12 und 13 ersichtlich wird.

Entgegen der Vermutung von Kloft (1976) konnte im von ihm diskutierten Bereich (1.7 bis 15.4 cm^2 pro Biene) kein Einfluß des Platzangebots festgestellt werden.

Beim Vergleich verschieden großer Versuchsgruppen zeigten Gruppen von 80 Bienen einen geringfügig intensiveren Futteraustausch, als halb so große Gruppen. Pershad (1967) fand eine deutlich langsamere Verteilung der Futterlösung in größeren Gruppen. Da sie aber jeweils nur eine Spenderbiene mit unterschiedlich großen Empfängergruppen zusammenbrachte, verminderten sich die Chancen der einzelnen Biene, von dieser Spenderin gefüttert zu werden, mit zunehmender Gruppengröße. In der vorliegenden Untersuchung wurde stets ein Verhältnis von 10% Spenderinnen zu 90% Empfängerinnen aufrechterhalten. Deswegen können für die geringfügig unterschiedliche Verteilungsgeschwindigkeit nur unterschiedliche Verhaltensweisen der Bienen verantwortlich sein. Ein stärkerer Gruppenzusammenhalt von größeren Einheiten, der sich in intensiverem Futteraustausch äußert, ist durchaus denkbar.

Zusätzlich angebotene Futterquellen haben in Abhängigkeit von ihrer Zuckerkonzentration einen verlangsamenden Einfluß auf die Verteilung der gefärbten Zuckerlösung. Anscheinend treten die verschiedenen Futterquellen in Konkurrenz zueinander, so daß ihre Qualität das Ausmaß der Verteilung, bestimmt.

Da sich kein Unterschied zur Kontrollgruppe ohne zusätzliche Futterquelle ergab, konnte die zusätzlich gebotene 20%ige Invertzuckerlösung die Verteilung der 50%igen Zuckerlösung mit Farbstoff nicht beeinflussen. Dagegen wurde durch das Angebot einer 70%igen Zuckerlösung das Ausmaß der Verteilung der Farblösung vermindert. Es ist anzunehmen, daß stattdessen dieses 70%ige Futter intensiver unter den Bienen verteilt wurde.

Wenn man bedenkt, daß der soziale Futteraustausch bei staatenbildenden Insekten die Funktion der Informationsweitergabe über die Situation des Volkes hat (Nixon und Ribbands, 1952), so erscheint dieses Verhalten durchaus sinnvoll.

Für die Futterquelle mit 50%iger Zuckerlösung wäre eine gleichberechtigte Verteilung von gefärbtem und ungefärbtem Futter und somit eine Zwischenstellung zwischen den Häufigkeitsprofilen der Versuchsgruppen bei 20%iger und 70%iger Zufütterung zu erwarten gewesen. Da sich die Verteilungsintensität aber nicht von der in Gruppen mit 70%igem Futterangebot unterscheidet, muß angenommen werden, daß die ungefärbte Zuckerlösung von den Bienen bevorzugt wurde. Es ist möglich, daß der Farbstoff für sie einen unangenehmen Geschmack hat, oder daß die unnatürliche Farbe beim Futteraustausch stört.

In Einzelbeobachtungen war festzustellen, daß Bienengruppen mit reichlichen Futterrörräten in ihren Honigmägen, trotz einstündiger Hungerzeit, die Farblösung nur in geringem Ausmaß verteilten. Diese Beobachtung läßt sich jedoch nicht als

allgemeine Regel aufstellen, da kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem durchschnittlichen Honigmagengewicht und der Intensität der Futterverteilung besteht.

Allerdings läßt sich ein Einfluß des Fütterungszustandes auf die Futterverteilung auch nicht eindeutig ausschließen, da er von anderen nicht berücksichtigten Faktoren - z.B. dem Alter der Bienen (Pershad, 1967; Hallmen, 1984) - überlagert sein kann, oder der Bereich, in dem die Honigmagengewichte liegen, zu eng ist.

Die Möglichkeit, daß der Fütterungszustand einen störenden Einfluß auf die Ergebnisse haben konnte, wurde durch die Auswahl der Versuchsgruppen ausgeschlossen. Alle Gruppen, die zur Klärung einer Fragestellung miteinander verglichen wurden, hatten das gleiche durchschnittliche Honigmagengewicht.

4.3. Diskussion der Ergebnisse über die Verteilung des Akarizids im Bienenkörper

In Bienen, die in toto auf Radioaktivität untersucht wurden, um eine eventuelle Abnahme des Gesamtgehalts an CGA-50439 festzustellen, ließ sich keine zeitabhängige Veränderung des Akarizidgehaltes finden. Auch in der aus dem Inkubationsgefäß abgesaugten Luft war keine Radioaktivität nachweisbar. Daraus darf man schließen, daß der Wirkstoff, oder seine mit der angewandten Methode nicht abgrenzbaren Metaboliten, aus dem Körper der Biene nicht ausgeschieden wurden.

Dies ist lediglich beim Abkoten der Biene möglich. Um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden, wurden die Meßwerte der Darm- und Kotblasen-Probe verworfen, wenn Hinweise darauf vorlagen, daß die Biene während des Versuchs abgekotet hatte, also Kotpuren am Käfig waren, oder (in einigen Fällen) die

in Darm und Kotblase gefundene Wirkstoffmenge unter 50% des Durchschnittswertes der übrigen Versuchstiere aus der gleichen Gruppe lag.

Aus Gründen des Strahlenschutzes wurde die Radioaktivität so gering wie möglich dosiert und damit ein Fehler von bis zu 5% in Kauf genommen. Hieraus erklären sich bei der Wiederingangung des Wirkstoffs Abweichungen von maximal 4.6%.

Die Untersuchung einzelner Organe zeigt den Weg des Akarizids durch den Bienenkörper auf. Während im Honigmagen eine anfangs rasche, dann langsamere Abnahme der Wirkstoffmenge festzustellen ist, steigt der Gehalt im restlichen Verdauungstrakt im gleichen Verhältnis an. In Hämolymphe, Giftblase und Flugmuskulatur zeigt sich die auch für Wirbeltiere typische Kurve der Pharmakodynamik mit Anflutungsphase, Maximum und Eliminationsphase (Forth et al., 1980).

In der Hämolymphe waren schon 30 Minuten nach der Applikation fast maximale Konzentrationen von CGA-50439 erreicht. Nach 6 bis 12 Stunden fanden sich nur noch relativ geringe Wirkstoffkonzentrationen in der Hämolymphe.

An Hand der hier durchgeführten Untersuchungen kann keine Aussage darüber gemacht werden, wie das Akarizid in die Hämolymphe resorbiert wird. Conner et al. (1978) wiesen für mehrere Insektizide die Resorption direkt aus dem Honigmagen nach, so daß dieser Weg auch für CGA-50439 möglich erscheint. Alternativ dazu steht der mechanische Transport in den Mitteldarm und die Resorption aus diesem oder dem anschließenden Dünndarm.

Ebenso ist nicht zu klären, auf welchem Weg der Wirkstoff in die Kotblase gelangt. Da dieses Speicherorgan eine Kloake darstellt, ist eine "renale" Ausscheidung über die Malpighischen Gefäße genauso möglich, wie die direkte Exkretion in den Darm oder die Kotblase.

Kloft (1958) und Pershad (1967) untersuchten ebenfalls die

Resorption von Futter, das mit P^{32} markiert war, aus dem Honigmagen der Biene. Klofts Angabe der Resorptionsdauer von 2 bis 5 Stunden deckt sich in etwa mit den dargestellten Ergebnissen, während Pershad erst nach 12 bis 16 Stunden eine Abnahme der Radioaktivität im Honigmagen verzeichnete. Auch fand sie frühestens nach 4 Stunden Spuren von Phosphor in der Hämolymphe, dessen Konzentration ab 24 Stunden ein Plateau erreichte, das bis zum Versuchsende nach 48 Stunden anhielt. Auch wenn man die Verzögerung durch Futterverteilung in Bienengruppen, mit denen sie ihre Versuche durchführte, berücksichtigt, muß eine deutlich raschere Resorption und Ausscheidung des hier untersuchten pharmakologischen Wirkstoffs festgestellt werden.

In der Hämolymphe lagen maximal 5.7% der aufgenommenen Dosis an CGA-50439 vor. Da aus dem Verdauungstrakt ein größerer Anteil des Akarizids resorbiert wurde (bis zu 46.1%), hatte es sich wahrscheinlich auch in anderen Organen angereichert. Für die Flugmuskeln sowie den Stachelapparat wurde dies auch nachgewiesen. Es ist zu vermuten, daß nicht untersuchte Gewebe ebenfalls den Wirkstoff enthielten.

Die Flugmuskulatur scheint eine rasche Bindungs- und Abgabefähigkeit für CGA-50439 zu haben, was aus dem steilen Ansteigen und Abfallen der Konzentration in der Brustmuskulatur abzulesen ist. Allerdings kann dieses Ergebnis aufgrund der geringen Probenzahl nur den Charakter eines Hinweises haben.

Um festzustellen, ob der Imker bei einem Bienenstich mit dem Akarizid kontaminiert wird, wurde die Wirkstoffmenge in der Giftblase bestimmt.

Der Wirkstoffgehalt von Giftblase und gesamtem Stachelapparat kann für die Inkubationszeiten von 4, 6 und 12 Stunden verglichen werden. Die Werte für Stachelapparate

liegen knapp über denen für isolierte Giftblasen, was vermutlich auf den Anteil an Akarizid in anhaftendem Gewebe und der Muskulatur zurückzuführen ist. Da nach 2 Stunden Versuchsdauer keine Meßwerte von isolierten Giftblasen vorliegen, kann nicht entschieden werden, ob der hohe Wirkstoffgehalt im Stachelapparat auf den zu dieser Zeit sehr hohen Wirkstoffgehalt in der Muskulatur zurückzuführen ist, oder ob die Akarizidmenge in der Giftblase bis zu 2 Stunden weiter ansteigt und nur wenig unter der im Gesamtorgan gemessenen Menge liegt.

Unter der Voraussetzung, daß der überwiegende Teil des Wirkstoffs im Bienengift und nicht im Gewebe der Blasenwand enthalten ist, kann er bei einem Bienenstich dem Opfer injiziert werden. Nach Müller (1938) gibt eine Biene beim Stich in Leder abhängig von der Temperatur zwischen 19 und 75% ihres Giftvorrates ab. Die dabei eventuell injizierte Akarizidmenge ist zusätzlich noch abhängig vom zeitlichen Abstand nach der Aufnahme des Medikaments. Eine Stunde nach der Aufnahme des Akarizids können nach den vorliegenden Ergebnissen also maximal 29.3 ng CGA-50439 injiziert werden, nach 12 Stunden nur noch zwischen 2.3 und 9.2 ng.

Die Milben scheinen CGA-50439 hauptsächlich innerhalb der ersten 6 Stunden nach der Ingestion durch die Biene aufzunehmen, was sich leicht erklären läßt, da die Konzentration in der Hämolymphe nach dieser Zeit nur noch gering ist. Die akarizide Wirkung tritt aber offensichtlich verzögert ein, denn es wurden erst nach 12 Stunden tote Milben gefunden und die Wirkstoffmenge von abgefallenen und überlebenden Milben unterscheidet sich nicht.

Da die Meßwerte einzelner Milben aufgrund der geringen Radioaktivität mit einem großen Fehler behaftet sind, können keine genauen Angaben über die aufgenommene Wirkstoffmenge gemacht werden.

Die nach 24 Stunden abgefallenen Milben aus behandelten

Völkern hatten zwischen 6 und 8 ng CGA-50439 aufgenommen. Auch diese Werte liegen in der hier gefundenen Größenordnung von unter 10 ng pro Milbe.

4.4. Gesamtbetrachtung der Ergebnisse

Die Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit waren

1. den direkten Nachweis der Verteilung eines systemischen Akarizids im Bienenvolk zu führen und ihr Ausmaß zu bestimmen, wobei insbesondere zu klären war, ob durch ein systemisch wirkendes Akarizid Milben in der verdeckelten Brutzelle erreicht werden;
2. die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Versuchen an Bienengruppen auf die Verhältnisse im Volk zu prüfen;
3. den Nachweis zu erbringen, daß ein systemisches Akarizid in die Hämolymphe der Biene übertritt und von der Milbe aufgenommen wird.

Aus den Arbeiten von Nixon und Ribbands (1952) läßt sich ableiten, daß mit dem Futterstrom im Bienenvolk eine Verabreichung von Medikamenten an alle Bienen möglich ist. Ruttner et al. (1980) erbrachten den Beweis der Verteilung des systemischen Akarizids Chlordimeform indirekt über den Nachweis seiner Wirkung auf Varroa-Milben. Moritz (1982), sowie Shabanov et al. (1984) untersuchten die Verteilung der Behandlungslösung im Bienenvolk und setzten voraus, daß sich der zugesetzte akarizide Wirkstoff in der gleichen Weise verteilen würde. Diese Annahme berücksichtigt jedoch nicht unterschiedliche Eigenschaften von Tracer und Wirkstoff, wie Resorbierbarkeit aus dem Honigmagen, Anlagerung an Bienen-gewebe und Verhalten im Stoffwechsel, so daß die Verhältnisse nur bedingt vergleichbar sind und zumindest eine quantitative

Aussage nicht möglich ist. Insbesondere ist die Schlußfolgerung von Shabanov et al., durch den Nachweis von Radioaktivität in Milben, die aus markierter Glucose stammt, wäre der Nachweis des Akarizids in den Milben erbracht, unzulässig.

Da bei den vorliegenden Untersuchungen mit einem radioaktiv markierten Akarizid gearbeitet wurde, darf angenommen werden, daß die Verteilung der Radioaktivität der Verteilung des Wirkstoffs entspricht. Allerdings kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob das Akarizid in der verabreichten Form vorliegt, oder zu Metaboliten umgewandelt wurde. Ebenso wenig läßt sich mit dieser Methode entscheiden, ob die akarizide Wirkung an die ursprüngliche Form gebunden ist, oder auch von Metaboliten ausgeht. Für die Fragestellung dieser Arbeit ist das Auftreten von Metaboliten jedoch von untergeordneter Bedeutung, da die Wirksamkeit von CGA-50439 erwiesen ist.

Das Akarizid wird unter den Bienen nicht gleichmäßig verteilt. Die annähernd erreichte Normalverteilung genügt jedoch für einen Behandlungserfolg. Bienenlarven nehmen bei der hier verabreichten Dosis kaum CGA-50439 auf, so daß Milben in verdeckelten Brutzellen nicht von der Behandlung erreicht werden.

Die Verteilung des Akarizids in Bienengruppen war wesentlich ungleichmäßiger als im Volk. Einerseits mögen dafür methodische Unterschiede, insbesondere die Applikationsweise - durch Beträufeln oder Zusetzen von gefütterten Bienen - verantwortlich sein. Zum anderen liegen in einem Volk mit Königin, Brut und Wabenbau grundsätzliche andere Verhältnisse vor, als in isolierten Bienengruppen. Daher können Laborversuche an Bienengruppen nur zum Vergleich verschiedener Medikamente herangezogen werden, aber keinen endgültigen Aufschluß über die Verteilung des Wirkstoffs im Bienenvolk geben.

Die Untersuchungen über die Verteilung von CGA-50439 im Bienenkörper zeigen, daß dieser Wirkstoff schon kurze Zeit nach der oralen Aufnahme in der Hämolymphe der Biene nachweisbar ist und daß das Akarizid oder seine Stoffwechselprodukte von Varroa-Milben auch aufgenommen werden. Dies zeigte sich auch bei der Untersuchung von abgefallenen Milben aus behandelten Wintervölkern.

Es kann nicht unbedingt vorausgesetzt werden, daß CGA-50439 in der Hämolymphe bei im Volk lebenden Bienen genauso schnell auftritt, wie bei den einzeln gehaltenen Versuchsbienen. Die isolierten Bienen verbrauchten die Futtervorräte in ihrem Honigmagen ausschließlich für den eigenen Stoffwechsel und resorbierten die gesamte Akariziddosis. Im Volk wird der Wirkstoff jedoch vielfach weitergegeben und verdünnt, so daß nicht anzunehmen ist, daß eine Biene ihre gesamte Dosis auf einmal erhält, sondern vielmehr in mehreren Portionen nacheinander. Die Tatsache, daß bei einzeln gehaltenen Bienen schon nach 4 Stunden kaum noch CGA-50439 im Honigmagen zu finden war, während sich in den Bienenvölkern bis zu 12 Stunden noch deutliche Veränderungen der Verteilung abspielten, unterstützt diese Annahme.

Eine Resorption von CGA-50439 erscheint entweder nur aus dem Darm oder auch aus dem Honigmagen möglich. Falls der Wirkstoff aus dem Honigmagen in die Hämolymphe übertritt, können alle Bienen, denen das Akarizid übertragen wird, es resorbieren. Falls es nur aus dem Darm aufgenommen werden kann, erscheint es nur bei den Bienen in der Hämolymphe, die Honigmageninhalt zum eigenen Verbrauch in den Darm weiterleiten.

Man kann daher vermuten, daß unter natürlichen Bedingungen im Bienenvolk die Hämolymphekonzentration von CAG-50439 niedriger bleibt und über einen längeren Zeitraum anhält als bei den untersuchten Einzelbienen. Die hohe Mortalität der Milben in Wintervölkern zeigt jedoch, daß ausreichend varoizide Konzentrationen erreicht wurden.

5. Zusammenfassung

Der Einsatz systemisch wirkender Medikamente gegen die Varroatose der Honigbiene (*Apis mellifera* L.) beruht auf dem sozialen Futteraustausch der staatenbildenden Insekten und der Resorption von Wirkstoffen in die Hämolymphe der Biene.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung eines akariziden Thiazolins in Bienenvölkern, Bienengruppen, sowie in Einzelbienen untersucht. Dabei kamen eine Isotopen-Tracer- und eine Farbstoff-Markierung zur Anwendung.

In Bienenvölkern wurde der Wirkstoff in einer Dosis von ca. 10 µg pro Biene durch Aufträufeln auf die Bienen in den Wabengassen appliziert.

Im Winter wurde ca. 12 Stunden nach der Anwendung eine Futterverteilung erreicht, die einer Normalverteilung entsprach. Unterschiedliche Klimafaktoren hatten keinen deutlichen Einfluß auf die Verteilung des Wirkstoffs. Für Sommervölker war nicht zu entscheiden, ob das Akarizid ähnlich wie im Winter, oder in weit geringerem Ausmaß verteilt wurde.

Bei einer Dosierung von 10 µg Wirkstoff pro Biene wurde weder im Sommer, noch im Winter eine ausreichende Konzentration erreicht, um *Varroa*-Milben in der verdeckelten Brutzelle abzutöten.

In kleinen Kästchen wurden gefütterte Spenderbienen einer Empfängergruppe im Verhältnis von 1 : 9 zugesetzt. Innerhalb von 6 Stunden wurde nur eine sehr heterogene Verteilung des Akarizids erreicht.

Mit Hilfe einer Farbmarkierung konnte in solchen Gruppen ein deutlicher Einfluß zusätzlicher Futterquellen auf die Verteilung des markierten Futters festgestellt werden. Dagegen beeinflusste die Gruppengröße den Futteraustausch nur gering und das Platzangebot, sowie die Füllung des Honigmagens hatten keine Auswirkungen auf die Futterverteilung.

Die Untersuchung von Einzelbienen ergab, daß das Akarizid nach oraler Aufnahme aus dem Verdauungstrakt resorbiert wird. Es konnte in Hämolymphe, Giftblase, Muskulatur und Varroa-Milben nachgewiesen werden. Bei einer einmaligen Applikation von 10 µg Wirkstoff pro Biene wurde die maximale Konzentration in der Hämolymphe mit 30 ng Wirkstoff pro µl nach 1 Stunde erreicht. Der markierte Wirkstoff wurde innerhalb von 6 Stunden in die Kotblase ausgeschieden und dort bis zur Defäkation gespeichert. Diese an einzeln gehaltenen Bienen ermittelten Ergebnisse lassen sich nur bedingt auf die Situation im Volk übertragen.

Das Resultat der vorliegenden Arbeit zeigt, daß die Verteilung des untersuchten Thiazolins in Bienenvölkern und in der Einzelbiene dem für systemische Akarizide vermuteten Wirkungsmechanismus entspricht.

Eyrich U.: The distribution of a systemically acting acaricide thiazoline for control of varroatosis in honeybee colonies (*Apis mellifera* L.)

Summary

The application of systemically acting substances against the varroatosis of the honeybee (*Apis mellifera* L.) bases on the exchange of food among social insects and on the resorption of pharmacological substances into the hemolymph of the bee.

In the presented investigations the distribution of an acaricide thiazoline was examined in honeybee colonies, groups of bees and within single bees, employing an isotope-tracer-technique and a colour-marking-technique.

In bee colonies the substance was applied in a dosage of 10 µg per bee by sprinkling it onto the bees in the beeways.

In winter, 12 hours after application a distribution of the acaricide was achieved that was adequate to a normal distribution. Different weather conditions did not have an effect on the distribution of the substance. Concerning summer colonies, it could not be determined whether the acaricide was distributed like in winter or to a far smaller extent.

With a dosage of 10 µg/bee neither in winter nor in summer a sufficient concentration was reached in larvae to kill Varroa mites in covered brood cells.

In small cages donor bees, that had been fed marked food, were added to a group of acceptor bees at a ratio of 1 : 9. Within 6 hours only a very heterogenic distribution of the acaricide was achieved.

By the means of colour -marking in such groups a clear influence of additional food sources on the distribution of marked food could be found. The size of group, however, effected the food exchange only slightly and neither available space nor food in the honey sac had an influence on the food distribution.

The examination of single bees showed, that the acaricide was resorbed from the digestive canal after oral application. The substance could be found in hemolymph, venom sac, muscle and Varroa mites. 1 hour after a single application of 10 µg active substance per bee, in the hemolymph the maximum concentration of 30 ng/µl was reached. The acaricide was eliminated into the rectum and stored there. These results, aquired with bees kept single, can be transferred only to a certain extent to the situation in the colony.

The results of the presented investigations show that the distribution of the tested thiazoline in honeybee colonies and within single bees is in agreement with the acting principle presumed for systemic acaricides.

6. Literaturverzeichnis

- Ball, B.V. (1963): The association of *Varroa jacobsoni* with virus diseases of honeybees. In R. Cavalloro (Hrsg.): Meeting of the EC experts' group, Wageningen 1983, Rotterdam: Balkema, 21-23
- Brem, S. (1980): Beitrag zur Varroadiagnostik. Berl. Munch. Tierarztl. Wschr. 93, 114-116
- Conner, W.E., C.F. Wilkinson, R.A. Morse (1978): Penetration of insecticides through the foregut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). Pestic. Biochem. Physiol. 9, 131-139
- Cooper, T.G. (1980): Biochemische Arbeitsmethoden. Übers. und bearb. von H.R. Maurer. Berlin, New York: de Gruyter, 61-96
- Crailsheim, K. (1985): Distribution of hemolymph in the honeybee (*Apis mellifica*) in relation to season, age and temperature. J. Insect Physiol. 31 (9), 707-713
- Cromroy, H.L., W. Kloft (1978): Probleme der Milbenseuche der Honigbiene, betrachtet aus weltweiter Sicht. Allg. Dtsch. Imkerztg. 12 (12), 354-358
- Deger, B. (1983): Varroa - ein harmloser Parasit im Bienen-volk? Allg. Dtsch. Imkerztg. 17 (6), 185-187
- Forth, W., D. Henschler, W. Rummel (1980): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 3. Aufl., Mannheim, Wien, Zürich: Bibliographisches Institut, 2 und 54-58
- Gösswald, K., W. Kloft (1958): Radioaktive Isotope zur Erforschung des Staatenlebens der Insekten. Umschau 24, 742-745
- Grobov, O.F. (1977): Varroasis in bees. In V. Harnaj (Hrsg.): Varroasis a honeybee disease. Bukarest: Apimondia-Verlag, 46-90

- Hänel, H. (1983): Der Einfluß von JH III auf die Reproduktion von *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 14 (2), 137-142
- Hallmen, M. (1984): Alters-Effekt auf die Trophallaxe bei Arbeiterinnen der Honigbiene *Apis mellifera carnica*, Pollmann. Examensarbeit im Fachbereich Biologie der Universität Frankfurt a. M.
- Jan-Tin-He (1965): Les particularités biologiques de l'acarien *Varroa jacobsoni* Oudemans (Original in Chinesisch). *Kounchong Zhishi* 9 (1), 40-41, zitiert in Grobov (1977)
- Ifantidis, M.D. (1983): Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone honeybee brood cells. *J. Apic. Res.* 22 (3), 200-206
- Ifantidis, M.D. (1984): Parameters of population dynamics of the *Varroa* mite on honeybees. *J. Apic. Res.* 23 (4), 227-233
- de Jong, D., P.H. de Jong, L.S. Goncalves (1982): Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *J. Apic. Res.* 21 (3), 165-167
- de Jong, D., J. Steiner, L.S. Goncalves (1984): Die *Varroa* in Brasilien. *Allg. Dtsch. Imkerztg.* 18 (1), 16-22
- Kloft, W., A.S. Djalal, W. Drescher (1976): Untersuchungen der unterschiedlichen Futterverteilung in Arbeiterinnengruppen verschiedener Rassen von *Apis mellifica* L. mit Hilfe von ³²P als Tracer. *Apidologie* 7 (1), 49-60
- Koeniger, N., G. Koeniger, N.H.P. Wijayagunasekara (1981): Beobachtungen über die Anpassung von *Varroa jacobsoni* an ihren natürlichen Wirt *Apis cerana* in Sri Lanka. *Apidologie* 12 (1), 37-40
- Langhe, A.B., K.V. Natzkii (1977): The mite *Varroa* and the methods of controlling it. In V. Harnaj (Hrsg.): *Varroasis a honeybee disease*. Bukarest: Apimondia-Verlag, 40-46
- Langhe, A.B., K.V. Natzkii, V.M. Tatzii (1976): Klechtch *Varroa*; podkhody k razrabolke sredstv. *Ptchelovodstvo* 13, 16-20, zitiert in Grobov (1977)

- Liu, T.P. (1982): A scanning electron microscope study of the female mite *Varroa jacobsoni* (Oudemans, 1904). *Am. Bee J.* 122 (6), 414-415
- Maul, V. (1983): Empfehlungen zur Methodik der Varroa-Elimination mittels Bannwaben aus Arbeiterbrut. *Allg. Dtsch. Imkerztg.* 17 (6), 179-184
- Moritz, R.F.A. (1982): Präparatverteilung bei systemischer Therapie von Ektoparasiten bei *Apis mellifera* L. *Apidologie* 13 (2), 127-141
- Moritz, R.F.A., H. Hänel (1984): Restricted development of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. in the cape honeybee *Apis mellifera capensis* Esch. *Z. angew. Entomol.* 97, 91-95
- Müller, E. (1938): Giftproduktion der Honigbiene. VII. Int. Congr. Entomol., Berlin, 1857-1864
- Nixon, H.L., C.R. Ribbands (1952): Food transmission within the honeybee community. *Proc. Roy. Soc. (B)* 140, 43-50
- Nixon, M. (1983): World maps of *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae*, with additional records for honeybee diseases and parasites previously mapped. *Bee World* 64 (3), 124-131
- Örösi-Pal, Z. (1977): Identifying the bee louse *Braula* and the big mite in Asia. In V. Harnaj (Hrsg.): *Varroasis a honeybee disease*. Bukarest: Apimondia-Verlag, 35-36
- Oudemans, A.C. (1904): Akarologische Anmerkungen XII. *Entomologische Berichte*, Amsterdam, 18, 156-169
- Pershad, S. (1967): Analyse de différents facteurs conditionnant les échanges alimentaires dans une colonie d'abeilles *Apis mellifica* L. au moyen du radioisotope P32. *Ann. Abeille* 10 (3), 139-197
- Ritter, W. (1981): Varroa disease of the honeybee *Apis mellifera*. *Bee World* 62 (4), 141-153
- Ritter, W. (1984): Neuester Stand der diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen zur Bekämpfung der Varroatose. *Tierärztl. Umsch.* 39 (2), 122-127

- Ritter, W. (1985): First results from biological trials with Apitol: A medicament with systemic activity. 30. Apimondia-Congress Nagoya (Japan) 1985, im Druck
- Ritter, W. (1986 a): Versuche zur Entwicklung und Prüfung von Perizin, einem systemischen Medikament zur Bekämpfung der Varroatose der Honigbiene. Tierärztl. Umsch. 41 (2), 105-112
- Ritter, W. (1986 b): Pers. Mittl.
- Ritter, W., D. de Jong (1984): Reproduction of Varroa jacobsoni O. in Europe, the Middle East and the tropical South America. Z. angew. Entomol. 98, 55-57
- Ritter, W., W. Koch (1986): Sekundärinfektionen der Varroatose. In Vorbereitung
- Ritter, W., F. Perschil (1982): Diagnose und Bekämpfung der Varroatose. Allg. Dtsch. Imkerztg. 16 (5), 129-130
- Ritter, W., F. Ruttner (1980): Diagnoseverfahren. Allg. Dtsch. Imkerztg. 14 (5), 134-138
- Ritter, W., F. Perschil, R. vom Hövel (1983): Erkennen der Varroatose mit einfachen Untersuchungsmethoden. Allg. Dtsch. Imkerztg. 17 (7), 221-222
- Ritter, W., T. Sakai, K. Takeuchi (1980): Entwicklung und Bekämpfung der Varroatose in Japan. In V. Harnaj, F. Gnädinger, F. Ruttner (Hrsg.): Diagnose und Therapie der Varroatose. Bukarest: Apimondia-Verlag, 69-71
- Rojahn, A. (1984): Bekämpfung der Varroatose in der Bundesrepublik Deutschland. Allg. Dtsch. Imkerztg. 18 (12), 382-386
- Rosenkranz, P., W. Engels (1985): Konsequente Drohnenbrutentnahme, eine wirksame biotechnische Maßnahme zur Minderung der Varroatose-Schäden an Bienenvölkern. Allg. Dtsch. Imkerztg. 19 (9), 265-271
- de Ruijter, A., N. Pappas (1983): Karyotype and sex determination of Varroa jacobsoni Oud. In R. Cavalloro (Hrsg.): Meeting of the EC experts' group, Wageningen 1983. Rotterdam, Balkema, 41-44

- Ruttner, F., N. Koeniger (1980): Eine biologische Methode zur Eliminierung der Varroa-Milben aus Bienenvölkern. Allg. Dtsch. Imkerztg. 14 (1), 11-12
- Ruttner, F., W. Ritter (1980): Das Eindringen von Varroa jacobsoni in Europa im Rückblick. Allg. Dtsch. Imkerztg. 14 (5), 129-134
- Ruttner, F., H. Marx, G. Marx (1984): Beobachtungen über eine mögliche Anpassung von Varroa jacobsoni an Apis mellifera L. in Uruguay. Apidologie 15 (1), 43-62
- Ruttner, F., W. Ritter, W. Götz (1980): Chemotherapie der Varroatose über die Hämolymphe der Biene. Allg. Dtsch. Imkerztg. 14 (5), 160-166
- Sachs, L. (1984): Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden. 6. Aufl., Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer, 256-258
- Sadov, A.V. (1976): Isutschenije samki Varroa. Ptchelovodstvo 8, 15-16, zitiert in Grobov (1977)
- Salchenko, V.L. (1966): K biologii i epizootologii klechtcha Varroa jacobsoni. Sbornik trudov "Problemy sel'skovo khozianstva Priamouria", Blagovestchensk, 1, 246-247, zitiert nach Grobov (1977)
- Samsinak, K., O. Haragasim (1977): The mite Varroa jacobsoni Oudemans occurs in Europe. In V. Harnaj (Hrsg.): Varroasis a honeybee disease. Bukarest: Apimondia-Verlag, 26-28
- Schley, P., G. Heinz (1985): Die Thermobehandlung gegen Varroamilben. Die Biene 121 (8), 372-374
- Shabanov et al. (1984): Dynamik der Verfütterung von therapeutischen Zuckerlösungen und ihre Verteilung im Organismus der Bienen, Drohnen und Larven und im Honig. Unveröffentlicht
- Siegel, S. (1976): Nichtparametrische Statistische Methoden (Nonparametric statistics for the behavioral sciences). Frankfurt: Fachbuchhandlung für Psychologie, Verlagsabteilung, 167-176

- Smirnov, A.M. (1979): Aktuelle Ergebnisse der sowjetischen Wissenschaft über Ätiologie, Pathogenie, Epizootologie, Diagnose und Bekämpfung der Varroatose. In V. Harnaj, M. Rousseau (Hrsg.): Bekämpfung und Vorbeugung der Varroatose. OIE/Apimondia-Seminar über Bienenpathologie, Bukarest 1978. Bukarest: Apimondia-Verlag, 60-74
- Smirnov, A.M., E.A. Kudrjawzew (1977): Kletchtch Varroa i guilzowije bolesni. Ptchelovodstvo 5, 13-14, zitiert in Smirnov (1979)
- Snodgrass, R.E. (1963): Die Anatomie der Honigbiene. In R.A. Grout, F. Ruttner (Hrsg.): Beute und Biene. Grundlagen und Methoden der amerikanischen Magazin-Imkerei. München: Ehrenwirth
- Wachendörfer, G., A. Klepsch, W. Stoya, E. Kaiser (1985): Derzeitiger Stand der medikamentellen Behandlung der Varroatose mit neuen Ameisensäure-Verdunstungssystemen. Allg. Dtsch. Imkerztg. 19 (10), 300-305
- Wahl, K. (1978): Aus der sowjetischen Imker-Zeitschrift "Pschelowodstwo". Allg. Dtsch. Imkerztg. 11 (10), 306
- Weiß, K. (1980): Über die Entstehung der weiblichen Bienenkassen. In F. Ruttner (Hrsg.): Königinnenzucht. Bukarest: Apimondia-Verlag

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. W. Ritter für die großzügige Arbeitsmöglichkeit in seiner Abteilung und die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung meiner Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. R. Gothe, Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, bedanke ich mich für die Überlassung des Themas.

Herrn Dr. Ch. Czoppelt, Max-Planck-Institut für Biochemie in München, sowie Dr. E. Färber, Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg, danke ich für die Anregungen und Hinweise zur Arbeit mit radioaktiven Isotopen.

Den Mitarbeitern der Abteilung für Bienenkunde danke ich für wertvolle Diskussionsbeiträge und Anregungen. Insbesondere danke ich Herrn F. Perschil und Herrn R. vom Hövel für Anleitung und Mithilfe bei imkerlichen Arbeiten und Frau B. Jehle für die Unterstützung bei Arbeiten im Labor.

Für die Benutzung des Flüssigkeitsszintillationszählers bedanke ich mich bei Herrn Dr. F. Baum und bei Herrn Dr. T. Mühl für die Bereitstellung von flüssigem Stickstoff.

Herrn Dr. Ch. Galanos, Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg, danke ich für die Arbeitsmöglichkeit am Oxidationsgerät.

Lebenslauf

Am 27. September 1958 wurde ich in Landshut/Niederbayern als Tochter des Landwirts Wilhelm Lueg und seiner Ehefrau Ilse, geb. Wünnenberg, geboren.

In den Jahren 1964 bis 1969 besuchte ich die Volksschule Burgharting und die Volksschule St. Martin in Landshut. Am 29. Juni 1978 erlangte ich am Hans-Leinberger-Gymnasium in Landshut die Allgemeine Hochschulreife.

Ich nahm im Wintersemester 1978/79 das Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Fakultät in München auf und legte am 11. Juli 1984 die Tierärztliche Prüfung ab.

Am 11. Juni 1983 schloß ich die Ehe mit dem Tierarzt Heinz Eyrich.

Die Approbation als Tierärztin wurde mir am 19. Juni 1985 erteilt. Seit August 1984 war ich am Tierhygienischen Institut Freiburg mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation beschäftigt.

